

UNTERSUCHUNGEN AN
TEMPERATURSENSIBEL ATMUNGSDEFEKTEN
MUTANTEN VON
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

INDUKTION – SELEKTION – CHARAKTERISIERUNG

Walter Pretsch

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0061

Aus dem Genetischen Institut der Universität München

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. F. Kaudewitz

UNTERSUCHUNGEN AN
TEMPERATURSENSIBEL ATMUNGSDEFEKTEN MUTANTEN
VON SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE
INDUKTION - SELEKTION - CHARAKTERISIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des
Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Walter Pretsch
aus Fellbach (Württ.)
München 1976

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 1977



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Marke: Den unerforschlich tief
geheimnisvollen Grund,
wer macht der Welt ihn kund?

Tristan: O König, das
kann ich dir nicht sagen;
und was du frägest,
das kannst du nie erfahren.

(R. Wagner, Tristan und Isolde)

Für M.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1973 bis 1975 am Genetischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz durchgeführt.

Ihm gilt für sein Interesse und seine Förderung meiner Arbeit, sowie für die Bereitstellung eines Laborplatzes mein besonderer Dank.

Herrn Dr. K. Wolf danke ich für die zahlreichen Ratschläge, für Anregungen und die vielen Diskussionen.

Danken möchte ich aber auch all den anderen Mitarbeitern des Instituts, die mir in großen und kleinen Dingen geholfen und so zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Dem Freistaat Bayern gilt mein Dank für die finanzielle Förderung durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz, das mir die Ausführung meines Vorhabens überhaupt erst ermöglicht hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Verwendete Hefestämme	5
2.2	Medien	5
2.3	Genetische Methoden	5
2.4	Biochemische Methoden	9
2.5	Abkürzungen	10
3	Ergebnisse	11
3.1	Induktion und Selektion der Mutanten	11
3.1.1	Mutagenese mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin	11
3.1.2	Selektion temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten	15
3.2	Genetische Eigenschaften der Mutanten	17
3.2.1	Reinigung der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten vor der genetischen Analyse	17
3.2.2	Freisporanalyse im Rückkreuzungsverfahren	17
3.2.3	Sporulationsdefekte Mutanten von Schizosaccharomyces pombe	22
3.2.4	Diploidisierungen mit der Mutante mei3-71	22
3.2.5	Diploidisierungen mit der Mutante mei1-102	25
3.2.6	Haploidisierung als Mittel zur genetischen Kartierung	25
3.2.7	Unterschiedliche Wirksamkeit von para-Fluorphenylalanin und meta-Fluorphenylalanin bei der Haploidisierung	26
3.2.8	Haploidisierung der vom Stamm mei3-71 gewonnenen Diploiden	29
3.2.9	Haploidisierung der mit dem Stamm mei1-102 gewonnenen Diploiden. Versuch einer Kartierung der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten	30
3.2.10	Alleliebeziehungen temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten untereinander	35
3.2.11	Komplementationsuntersuchungen temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten untereinander	40
3.2.12	Genetische Untersuchung einer nichtkonditionalen atmungsdefekten Rekombinante	41

3.2.13	Atmungskompetente Revertanten der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten	42
3.3	Physiologische Untersuchungen an den temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten	43
3.3.1	Wachstumscharakteristika	45
3.3.2	Prüfung der Mutanten auf ihre Befähigung zur Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu Triphenylfor- mazan	46
3.3.3	Osmotische Heilbarkeit	49
3.4	Biochemische Untersuchungen	51
3.4.1	Tests für die enzymatische Aktivität der Atmungskette	51
3.4.2	Ergebnisse der enzymatischen Tests	53
4	Besprechung der Ergebnisse	59
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	69

1 Einleitung

Die meisten Hefen sind in der Lage, ihre Energie sowohl durch Atmung als auch durch Gärung zu gewinnen; somit besteht die Möglichkeit, Mutanten zu isolieren, welche die Fähigkeit der Atmung eingebüßt haben und ausschließlich durch Gärung ihren Bedarf an Energie decken können. Sie sind dadurch definiert, daß sie auf unvergärbaren Substraten nicht wachsen können.

Viele wichtige Reaktionen der Zelle gehen in den Mitochondrien vor sich. So ist auch die Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ im Zitronensäurezyklus, die stufenweise Oxidation dieses Substrats über die Atmungskette und die daran gekoppelte oxidative Phosphorylierung an die Struktur der Mitochondrien gebunden. Atmungsdefekte Mutanten weisen Störungen der Funktion dieser Zellorganellen auf. Sie können bei verschiedenen Hefearten spontan oder nach Einwirkung mutagener Agentien auftreten. Durch chemische oder physikalische Methoden ist es möglich, Mutanten zu erhalten, die zur Atmung nicht mehr befähigt sind und bei denen folglich Mutationen in Genen stattfanden, welche die Synthese von Enzymen der Atmungskette oder ihrer Trägerstrukturen kontrollieren.

Die meisten der früheren Untersuchungen über die Atmung bei Hefen wurden an Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces carlsbergensis durchgeführt. Im einzelnen werden zwei Mutanten-Gruppen unterschieden:

1. Extrakaryotische "petite" Mutanten (vegetative Petites)
entstehen durch Mutation, die entweder auf totalem Verlust der mitDNS (rho^0 -Zustand) oder auf großen Deletionen der Wildtyp-mitDNS mit Kompensation durch Reiteration nichtdeletierter

Segmente (ρ^- -Zustand) beruhen (Faye et al., 1973). Der Beweis des nichtmendelnden Erbgangs dieser Mutanten wurde durch Ascus- und Heterokaryon-Analysen erbracht. Vegetative Petites können spontan oder mit hoher Häufigkeit nach Behandlung mit Ethidiumbromid (Slonimski et al., 1968) und Acriflavin entstehen (Ephrussi et al., 1949 a; Ephrussi et al., 1949 b). Dabei bilden diese Substanzen Komplexe mit der mitDNS, die zum Bruch und schließlich zum Abbau der mitDNS führen (Goldring et al., 1970). Spektroskopische Untersuchungen haben weiterhin das Fehlen einer Reihe von Enzymen der Atmung gezeigt, die in den Mitochondrien lokalisiert sind.

2. Karyotische "petite" Mutanten sind den vegetativen Petites phänotypisch ähnlich, zeigen jedoch Mendelsche Segregation bei der Kreuzung mit atmungskompetenten Stämmen. Bei ihnen ist die mitDNS nicht verändert (ρ^+ -Zustand).

Atmungsdefekte karyotische Mutanten von Saccharomyces cerevisiae mutieren häufig teilweise oder ganz zum ρ^- -Zustand weiter (Sherman, 1963; Sherman and Slonimski, 1964), wodurch die Analyse karyotischer Mutanten erschwert wird. Geeigneter für derartige Untersuchungen ist die Spaltheife Schizosaccharomyces pombe. Von ihr wurden durch verschiedene Autoren atmungsdefekte Mutanten isoliert (Heslot et al., 1970; Wolf et al., 1971; Wolf, 1973; Goffeau et al., 1972). Sie erwiesen sich sämtlich als karyotisch.

Auch unter Induktionsbedingungen, die bei Saccharomyces cerevisiae zu einem hohen Prozentsatz cytoplasmatischer Mutanten führten, konnten solche bei Schizosaccharomyces pombe nicht gefunden werden. So induziert Ethidiumbromid bei Schizosaccharomyces pombe keine stabi-

len cytoplasmatischen Petites. Schwab et al. (1971) zeigten, daß Ethidiumbromid zwar zum Erlöschen der Atmungskompetenz in allen behandelten Zellen führt, was durch Verlust der Fähigkeit, auf Glycerin-Medium Kolonien zu bilden, Atmungsmessungen und Abnahme der Cytochrome $a+a_3$ nachgewiesen wurde. Nach Überimpfung in ethidiumbromidfreies Medium zeigten diese Zellen Rückkehr zur Atmungskompetenz.

Bulder (1964) überprüfte eine Vielzahl von Hefearten und teilte sie bezüglich ihrer Fähigkeit oder Unfähigkeit ein, nach Acriflavin-Behandlung atmungsdefekte Mutanten hervorzubringen. Dabei unterschied er zwischen "petite positiven" und "petite negativen" Hefen. Das Kriterium der Mutanten-Selektion war das Fehlen der Cytochrome a und b. Zwischen vegetativen und karyotischen Petites wurde dabei genetisch nicht unterschieden. - Schizosaccharomyces pombe stellte er bei dieser Einteilung zwischen die beiden Gruppen, weil atmungsdefekte Mutanten selten auftraten und schwer zu isolieren waren. Unter Bedingungen, die bei Saccharomyces cerevisiae 50 bis 100 % Petites induzierten, konnten nur wenige atmungsdefekte Kolonien erhalten werden. Es wurde deshalb die Vermutung ausgesprochen, daß cytoplasmatisch atmungsdefekte Mutanten bei Schizosaccharomyces pombe nicht lebensfähig sind (Heslot et al., 1970).

Bei Saccharomyces cerevisiae führte der Einsatz von konditionellen Mutanten zu einer interessanten Erweiterung des Spektrums der bisher bekannten Mutanten. Weislogel und Butow (1970) isolierten einen kältesensiblen Stamm mit dem zur Selektion geeigneten Merkmal "keine Koloniebildung bei 18° C auf nichtvergärbaren Kohlenstoffquellen". Während der Aufzucht bei dieser Temperatur (oder bei

28° C in Gegenwart von Chloramphenicol) steigt die Mutationsrate zu cytoplasmatischen Petites nach 5 Generationen auf 90 % an. Der Erbgang dieser Mutation ist karyotisch. Handwerker et al. (1973) isolierten eine temperatursensible Mutante, die bei Vermehrung in der nichtpermissiven Temperatur (35° C) ebenfalls einen starken Anstieg der Mutationsrate zu rho⁻ zeigt. Dadurch bilden innerhalb von 4 bis 6 Generationen 90 % der Zellen petite-Kolonien. Die genetische Analyse weist einen mitochondrialen Erbgang dieser temperatursensiblen Mutation nach.

Bisher wurden ausschließlich allgemein temperatursensible Mutanten von Schizosaccharomyces pombe isoliert (Bonatti et al., 1972). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Induktion, Selektion und Charakterisierung temperatursensibler atungsdefekter Mutanten, die also nur bei Raumtemperatur (23° C), nicht jedoch bei der erhöhten Temperatur von 36° C auf glycerinhaltigem Medium Kolonien bilden. Damit besteht die Chance, die Wechselwirkung der Atmungskette besser untersuchen zu können und Mutanten zu isolieren, die bisher nicht gefunden wurden, weil sie unter normalen Kulturbedingungen nicht lebensfähig sind; möglicherweise befinden sich unter diesen Mutanten des konditionellen Typs solche mit mitochondrialem Erbgang der Atmungsdefizienz.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Hefestämme

Schizosaccharomyces pombe

Genotyp	Stamm-Nr.	Phänotyp
-/h ⁻	972	Wildtyp
-/h ⁺	975	Wildtyp
ade6/h ⁻ /h ⁺	210	adeninauxotroph
ade6/h ⁻ /h ⁺	216	"
ade7/h ⁻ /h ⁺	50	"
arg1/h ⁻ /h ⁺	230	argininauxotroph
his3/h ⁻ /h ⁺	237	histidinauxotroph
leu1/h ⁻ /h ⁺	32	leucinauxotroph
lys1/h ⁻ /h ⁺	131	lysinauxotroph
ura1/h ⁻ /h ⁺	171	uracilauxotroph
mei1	102	defekt in Meiose I
mei3/h ⁻ /h ⁺	71	"

Die Wildtypen und auxotrophen Mutanten stammen aus der Sammlung von Herrn Prof. Leupold, Bern. Die sporulationsdefekten Mutanten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Egel, Freiburg i. Br., zur Verfügung gestellt.

2.2 Medien

Die verwendeten Medien (Hefeextrakt-Glucose-Medium, Hefeextrakt-Glycerin-Medium, Minimal-Medium, Sporulations-Medium) sind bei Leupold (1955) bzw. bei Wolf et al. (1971) beschrieben.

2.3 Genetische Methoden

2.3.1 Inaktivierung von Zellen durch N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

a) unter Bedingungen des Wachstumsstillstands

Zellen werden in Hefeextrakt-Glucose-Medium gezüchtet, bis die spät-logarithmische Phase erreicht ist, steril abzentrifugiert und zweimal in Acetatpuffer pH 5,0 gewaschen. Der Titer wird auf 2×10^7 Zellen/ml Puffer eingestellt. MNNG wird im Mörser pulverisiert und kurz vor Versuchsbeginn in Acetatpuffer gelöst (4 mg/ml). 2 ml Zellsuspension und 2 ml MNNG-Lösung werden bei 30°C unter mehrmaligem Schütteln inkubiert.

Für die Inaktivierungskinetik werden Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen, sofort in eiskaltem Acetatpuffer verdünnt und auf Glucose-Vollmedium plattiert.

b) unter Wachstumsbedingungen

Zellen werden in 50 ml Hefeextrakt-Glucose-Medium gezüchtet. Bei einem Titer von etwa $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml wird 1 ml einer frisch zubereiteten MNNG-Lösung (4 mg/ml) zugegeben (Endkonzentration: 0,08 mg MNNG/ml). Für die Inaktivierungskurve werden Proben zu verschiedenen Zeiten entnommen, verdünnt und auf Glucose-Vollmedium plattiert.

2.3.2 Selektion temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten

Zellen werden 35 bzw. 30 Minuten lang behandelt wie zuvor beschrieben. So erhält man etwa 13 bzw. 6 % Überlebende. Ungefähr 50 Überlebende Zellen pro Platte werden auf Glucose-Vollmedium plattiert und bei 23°C inkubiert, bis Kolonien herangewachsen sind. Es wird auf Glycerin-Vollmedium (Inkubation bei 23°C), Glycerin-Vollmedium (Inkubation bei 36°C) und Glucose-Vollmedium (Inkubation bei 36°C) gestempelt. Kolonien, die auf allen Platten mit Ausnahme der bei 36°C inkubierten Glycerin-Vollmedium-Platte gewachsen sind, werden abisoliert. Nach den Kriterien der Selektion werden die Mutanten mehrmals gereinigt und auf Schrägagar aufbewahrt.

2.3.3 Prüfung der Auxotrophie und des Paarungstyps

Die entsprechenden Methoden sind bei Leupold (1955) beschrieben.

2.3.4 Prüfung auf Haploidie bzw. Diploidie

a) Die zu untersuchende Kolonie wird auf Agar neben einem haploiden und einem diploiden Stamm ausgestrichen und 3 Tage lang bei 30°C

bebrütet. Anschließend erfolgt mikroskopischer Größenvergleich: diploide Zellen sind deutlich größer als haploide.

b) Die zu untersuchenden Kolonien werden auf Glucose-Agar abgestempelt, der 20 mg/l Phloxin B enthält. Die Platten werden 3 Tage bei 30° C inkubiert. Phloxin B dringt nur in tote Zellen ein. Da der diploide und aneuploide Zustand letaler ist, färben sich die Kolonien mit Phloxin B stärker an (= Phloxin B-positiv) als haploide.

2.3.5 Freisporanalyse und Tetradenanalyse

Diese wurden nach der von Leupold (1955) beschriebenen Methode ausgeführt.

2.3.6 Diploidisierung mit der Mutante mei3-71

Die beiden Partner, die zur Diploidisierung herangezogen werden, müssen folgende Voraussetzungen erfüllen:

- a) sie müssen entgegengesetzten Paarungstyp haben
- b) sie müssen beide das Gen mei3 besitzen
- c) der eine Partner muß die Auxotrophie ade6-210, der andere die ade6-216 besitzen

Suspensionen spätlogarithmischer Kulturen werden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und davon 0,1 ml auf der Oberfläche eines Schrägröhrchens mit Sporulationsmedium (supplementiert mit 75 mg/l Adenin) verteilt. Nach 2 Tagen Inkubation bei 25° C wird der Zellbelag in 1 ml sterilem H₂O suspendiert und eine 10-, 10²- und 10³-fache Verdünnung hergestellt. Von der unverdünnten Suspension und den Verdünnungen werden je 0,1 ml auf Minimalmedium mit 20 mg/l Phloxin B ausplattiert. Anschließend wird bei 23° C bebrütet und später einige große Phloxin B-positive Kolonien abisoliert.

2.3.7 Diploidisierung mit der Mutante mei1-102

Der Partner, der mit der Mutante mei1-102 ade6-210 diploidisiert werden soll, muß den Paarungstyp h⁻ und eine komplementierende Auxotrophie besitzen. Im Übrigen wird wie unter 2.3.6 verfahren.

2.3.8 Haploidisierung mit p- bzw. m-Fluorphenylalanin auf Festmedium
Anfangs wurde als Haploidisierungsmedium Glucose-Agar mit 0,12 % para-Fluorphenylalanin verwendet, später dann supplementiertes Mini-

malmedium mit 0,05 % meta-Fluorphenylalanin. Die diploide Kolonie wird mit der Üse auf Schrägröhrchen mit Haploidisierungsmedium übertragen und für 6 Tage bei 23° C inkubiert. Der Zellbelag wird in 5 ml sterilem H₂O suspendiert und 10²-, 10³- und 10⁴-fache Verdünnungen hergestellt. Es wird auf Glucose-Agar mit 20 mg/l Phloxin B plattiert und bei 23° C bebrütet. Durch Stempeln auf Minimalmedium werden die haploiden Kolonien bestimmt, auf supplementiertem Minimal-Agar die Auxotrophien und auf Glycerin-Agar die temperatursensible Atmungsdefizienz bzw. die Atmungskompetenz.

2.3.9 Haploidisierung mit p- bzw. m-Fluorphenylalanin in Flüssigmedium

Entsprechend supplementiertes Minimal-Flüssigmedium mit 0,12 % pFPA bzw. mit 0,05 % mFPA wird mit einer diploiden Kolonie beimpft. Die Inkubation erfolgt bei 23° C bis zur stationären Phase (etwa 5 Tage). Nach entsprechender Verdünnung wird auf Glucose-Agar mit 20 mg/l Phloxin B plattiert und weiter wie unter 2.3.8 verfahren.

2.3.10 Chromosomale Lokalisierung der rdt-Gene durch mitotische Haploidisierung

rdt-Mutanten (Definition in 3.1.2), die mit der Auxotrophie ade7-50 vorliegen, werden nach 2.3.7 mit der sporulationsdefekten Mutante mei1-102 ura1-171 his3-237 diploidisiert. Die Haploidisierung und Auswertung wird entsprechend 2.3.8 bzw. 2.3.9 vorgenommen.

2.3.11 Qualitative Kreuzungsanalyse temperatursensibler atmungsdefekter Mutanten untereinander

Je etwa 6 Mutanten werden, in ihrer ursprünglichen Form vom Paarungstyp h⁻, in parallelen Strichen auf einer Glucose-Agar-Platte ausgestrichen. Auf einer zweiten Platte werden in der gleichen Weise Nachkommen der Mutantenstämme ausgestrichen, die aus Kreuzung mit dem Wildtyp hervorgegangen sind und die die temperatursensible Atmungsdefizienz der Ursprungsmutante mit dem Paarungstyp h⁺ kombiniert haben. Nach 5 Tagen Bebrütung bei 23° C werden die beiden Platten kreuzweise auf Samt übereinandergestempelt und auf Sporulationsmedium übertragen. Nach 5 Tagen Inkubation (25° C) haben sich an sämtlichen Überkreuzungsstellen zahlreiche Asci gebildet

(Nachprüfung durch Jodreaktion). Jede Überkreuzungsstelle entspricht demnach einer eigentlichen Kreuzung. Von einer solchen Platte wird nun ein Abdruck auf eine Glycerin-Agar-Platte genommen. Während 10-tägiger Bebrütung bei 36° C ist in den Verbindungsstücken zwischen den einzelnen Überkreuzungsstellen sowie in den Überkreuzungsstellen der einen Diagonalen (d. h. in den Inzuchtkreuzungen zwischen den ursprünglichen Mutanten und ihren eigenen Nachkommen) erwartungsgemäß kein Wachstum eingetreten. An den anderen Überkreuzungsstellen zeigt sich unterschiedliches (Auftreten atmungskompetenter Rekombinanten) oder ebenfalls kein Wachstum.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Präparation mitochondrialer Partikel (Lang et al., 1975)

Wildtypen und temperatursensibel atmungsdefekte Mutanten werden in einer Flüssigkultur (Glycerin 5 %, Hefeextrakt 1 %, Pepton 1 %, pH-Einstellung auf 5,5 - 6 mit KH_2PO_4) zu einem Titer von etwa 10^6 Zellen/ml angeimpft. Der Ansatz erfolgt jeweils doppelt: ein Teil wird nach Aufzucht bei 23° C in der späten logarithmischen Phase bei einem Titer von etwa $1,5 \times 10^8$ Zellen/ml geerntet. Der zweite Ansatz wird bis zu einem Titer von etwa 5×10^7 Zellen/ml bei 23° C und dann noch für 48 Stunden bei 36° C inkubiert. Die Kulturen werden 10 Minuten bei 1000 x g abzentrifugiert und dann in destilliertem Wasser gewaschen. Das Zentrifugat wird in Mannitol- oder Sorbitolpuffer (1 M Mannitol bzw. 1,2 M Sorbitol, 10 mM Histidin, pH 6,5) in einer Konzentration von ca. 300 g nassen Zellen pro Liter Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgt durch Schütteln von 200 ml Suspension mit 800 g Glasperlen (ϕ 0,45 mm) in Literflaschen bei einer Frequenz von etwa 2 Hz bei 4° C. Durch mikroskopische Beobachtung wird festgestellt, wann etwa 60 bis 70 % der Zellen zer schlagen sind. Diese Suspension wird durch viermaliges Waschen mit 50 ml Puffer und Zentrifugation bei 46 000 x g während 15 Minuten von den Glasperlen befreit. Von den mitochondrialen Partikeln, welche die obere braune Zone des Zentrifugats bilden, wird nur die lockere Lage wieder in Puffer suspendiert.

2.4.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten

Die optischen Bestimmungen der enzymatischen Aktivitäten erfolgt in Küvetten von 1 cm Lichtweg bei 23° C bzw. 36° C in einem Beckman Spectrophotometer Model 24 mit temperierbarem Küvettenhalter. Die mitochondrialen Partikel werden 15 Minuten lang im Test-Puffer vorinkubiert. KCN wird in einer Konzentration von 0,05 M 1 Minute vor Start der Reaktion mit NADH oder Succinat zugegeben.

- a) NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase
modifiziert nach Hatefi und Rieske (1967)
- b) Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase
modifiziert nach Tisdale (1967)
- c) Cytochrom c - O₂ - Oxidoreduktase (Cytochromoxidase)
modifiziert nach Wharton und Tzagoloff (1967)

2.4.3 Proteinbestimmung

Die entsprechende Methode ist bei Lowry et al. (1951) beschrieben.

2.5 Abkürzungen

AA	Antimycin
mitDNS	mitochondriale Desoxyribonucleinsäure
EB	Ethidiumbromid
h ⁻	Paarungstyp heterothallisch -
h ⁺	Paarungstyp heterothallisch +
h ⁹⁰	Paarungstyp homothallisch
pFPA	para-Fluorphenylalanin
mFPA	meta-Fluorphenylalanin
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
rdt	temperatursensibel atmungsdefekt (rd = respiratory deficient, t = temperature sensitive)
RDT	Wildtyp-Allel von rdt
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

3 Ergebnisse

3.1 Induktion und Selektion der Mutanten

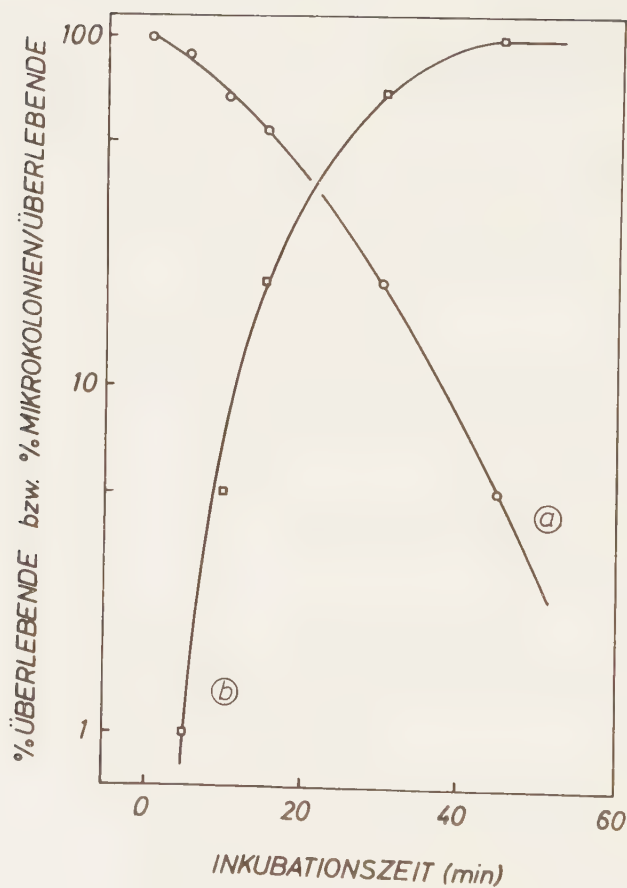
3.1.1 Mutagenese mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

MNNG wurde als potentes Mutagen bei verschiedenen Organismen und auch bei Schizosaccharomyces pombe zur Gewinnung von Mutanten verwendet.

Die Reaktionsweise des MNNG ist stark pH-abhängig (Fishbein et al., 1970). Weil sich der pH-Wert einer logarithmischen Hefekultur schnell zur sauren Richtung hin verändert (bis pH 4), wurde die Mutationsinduktion in Puffer bei pH 5 durchgeführt. Dadurch wird das MNNG möglichst stabil gehalten. Die Inaktivierung der Zellen durch MNNG in Abhängigkeit von der Zeit wurde für die Mutagenkonzentration 2 mg/ml Inkubationsgemisch durch Plattieren auf Vollmedium bestimmt. Der Titer betrug etwa 2×10^7 Zellen/ml, die Inkubationstemperatur 30°C . Die Inaktivierungskurve ist in Figur 3.1 dargestellt. Bei einer Inkubationsdauer von 35 Minuten erhält man eine Überlebensrate von etwa 10 %.

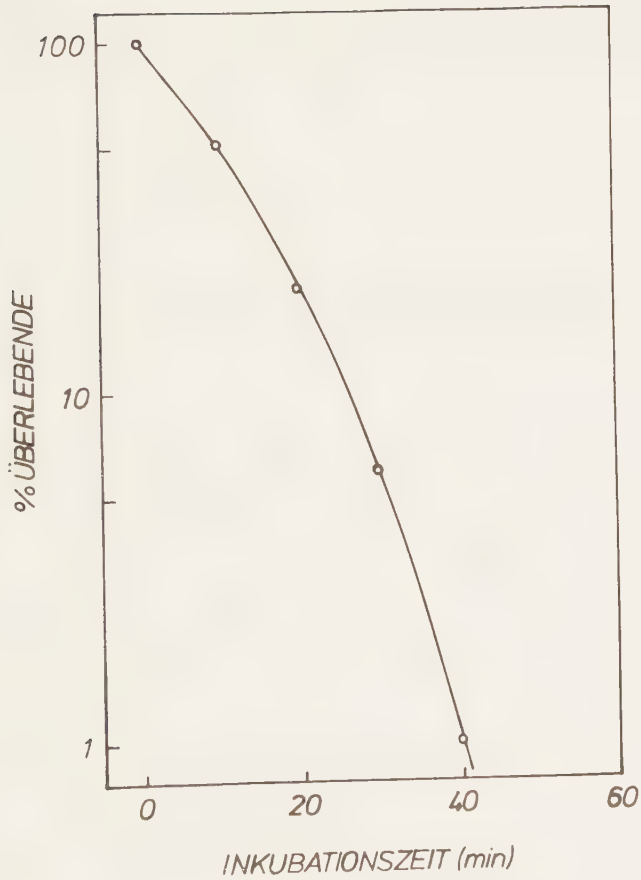
Für die Inaktivierung sich in der spätlogarithmischen Phase befindender Zellen in Puffer wurde für den 35-Minuten-Wert die Rate der Mutation zur temperatursensiblen Atmungsdefizienz bestimmt; sie beträgt etwa 10^{-4} Mutanten unter den Überlebenden.

Mit steigender Inkubationsdauer treten unter den Überlebenden "Mikrokolonien" auf (Figur 3.1), die sich auf Vollmedium durch geringere Koloniegröße deutlich von den normalen Kolonien unterscheiden. In welchen Eigenschaften bei Mikrokolonien und Kolonien norma-



Figur 3.1

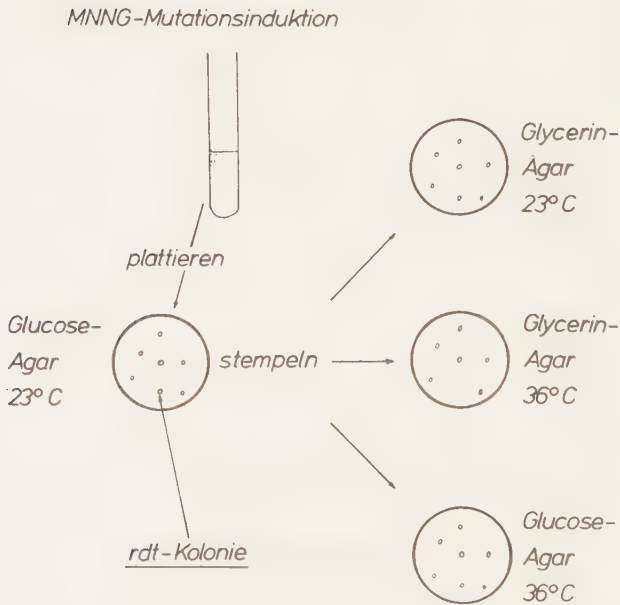
Abhängigkeit der Überlebensrate (a) und des Prozentsatzes induzierter Mikrokolonien (b) von der Dauer der Inkubationszeit in MNNG in Acetatpuffer pH 5 (200 bis 300 untersuchte Kolonien pro Meßpunkt)



Figur 3.2

Abhängigkeit der Überlebensrate von der Dauer der Inkubationszeit in MNNG unter Wachstumsbedingungen (200 bis 300 untersuchte Kolonien pro Meßpunkt)

ler Größe sonst noch Unterschiede bestehen, wurde nicht untersucht. Es ist anzunehmen, daß es sich bei den Mikrokolonien um infolge der MNNG-Behandlung in Wachstum und Zellteilung verlangsamte Mutanten handelt.



Figur 3.3

Selektion der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten (nähere Erläuterungen im Text unter 3.1.2)

MNNG bewirkt bei Bakterien Mutationen nur während der DNS-Replikation und dann in erster Linie in der Replikationsgabel. Es sollte daher auch der Effekt des Mutagens auf eine wachsende Hefekultur untersucht werden. Vorversuche ergaben, daß die MNNG-Konzentration dabei geringer bemessen werden kann als bei Induktion in Puffer. Es wurde eine Konzentration von 0,08 mg/ml Inkubationsgemisch gewählt. Das MNNG wurde pulverisiert in eine sich logarithmisch teilende Kultur gegeben, deren Titer etwa 2×10^6 Zellen/ml betrug. Die Inaktivierung unter Wachstumsbedingungen wurde bei 23°C durchgeführt. Die Inaktivierungskurve ist aus Figur 3.2 ersichtlich.

3.1.2 Selektion temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten

Die temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten wurden durch Stempeln der Glucose-Platten auf zwei Glycerin-Agar-Platten selektiert, von denen die eine bei 23°C, die andere bei 36°C mindestens 10 Tage lang inkubiert wurden (Figur 3.3). Zur Kontrolle wurde noch auf eine Glucose-Agar-Platte gestempelt (Inkubation ebenfalls bei 36°C). Glucose kann von Hefen sowohl vergoren als auch veratmet, Glycerin dagegen ausschließlich veratmet werden. Atmungsdefekte Mutanten können daher auf Glycerin-Medium keine Kolonien bilden. Insgesamt sind 8 verschiedene Phänotypen auf den Stempelplatten denkbar:

Phänotyp	Glucose-Medium Ink. 23°C	Glycerin-Medium Ink. 23°C	Glycerin-Medium Ink. 36°C	Glucose-Medium Ink. 36°C
1.	+	+	+	+
2.	+	+	+	-

Phänotyp	Glucose- Medium Ink. 23°C	Glycerin- Medium Ink. 23°C	Glycerin- Medium Ink. 36°C	Glucose- Medium Ink. 36°C
3.	+	+	-	+
4.	+	+	-	-
5.	+	-	+	+
6.	+	-	+	-
7.	+	-	-	+
8.	+	-	-	-

+ : Koloniebildung

- : keine Koloniebildung

Tatsächlich traten von diesen theoretischen Kombinationen im Versuch aber nur 5 auf: Diese sind:

1. phänotypisch Wildtyp, atmungskompetent
3. temperatursensibel atmungsdefekt
4. allgemein temperatursensibel
7. allgemein atmungsdefekt
8. temperatursensibel und atmungsdefekt

Als temperatursensibel atmungsdefekt (rdt) werden im folgenden solche Kolonien und Mutanten bezeichnet, welche auf der Glycerin-Stempelplatte bei 36°C keine Kolonien gebildet haben.

Mit dieser Methode wurden 20 rdt-Mutanten nach MNNG-Mutagenese in Acetatpuffer und 2 rdt-Mutanten (rdt-148 und rdt-149) nach MNNG-Mutagenese unter Wachstumsbedingungen erhalten.

3.2 Genetische Eigenschaften der Mutanten

3.2.1 Reinigung der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten vor der genetischen Analyse

Um eine Verfälschung der Kreuzungsergebnisse zu vermeiden, müssen vor Ansatz der Kreuzungen Paarungstyp, Heterothallie, ggf. temperatursensible Atmungsdefizienz und Auxotrophien der entsprechenden Kreuzungspartner geprüft werden (siehe Material und Methoden). So ist bei den h^+ -Stämmen zu beachten, daß spontane Mutationen dieses Paarungstyps zum homothallischen Paarungstyp h^{90} relativ häufig vorkommen (Leupold, 1950).

3.2.2 Freisporanalyse im Rückkreuzungsverfahren

Um die Möglichkeiten eines karyotischen bzw. extrakaryotischen Erbgangs der temperatursensiblen Atmungsdefizienz zu klären, wurden die isolierten Mutanten auf verschiedene Weise genetisch untersucht. In einem ersten Schritt wurden sie nach Reinigung mit verschiedenen atmungskompetenten auxotrophen Mutanten (*leu1-32*, *ura1-171*, *ade6-210*) rückgekreuzt. Zur Selektion der Ascosporen auf Glucose-Agar wurden die vegetativen Zellen mit 30 %igem Alkohol abgetötet.

Um die Segregation der Auxotrophien und der Atmungsdefizienz bzw. -kompetenz zu bestimmen, wurden die Kolonien auf Minimalmedium, entsprechend supplementiertes Minimalmedium und Glycerin-Agar gestempelt.

In den Tabellen 3.1 bis 3.3 sind die Ergebnisse der Rückkreuzungen zusammengefaßt und das Spalten der Marker ADE7 : *ade7*, LEU1 : *leu1*, URA1 : *ura1* bzw. ADE6 : *ade6* und RDT : *rdt* eingetragen. Der Grund

Tabelle 3.1

Ergebnisse der Kreuzung der Mutanten rdt-101 bis rdt-145 und des Ausgangsstammes ade7-50 mit der atemungskompetenten auxotrophen Mutante leu1-32

rdt	ADE7 : ade7	LEU1 : leu1	RDT : rdt	% rdt
101	120 : 260	195 : 185	220 : 160	42
104	138 : 198	182 : 154	166 : 170	51
105	144 : 246	198 : 192	182 : 208	53
106	174 : 182	200 : 156	202 : 154	43
108	83 : 95	88 : 90	84 : 94	53
109	88 : 84	87 : 85	83 : 89	52
110	126 : 142	226 : 42	122 : 146	54
112	172 : 231	208 : 195	225 : 178	44
115	99 : 134	123 : 110	94 : 139	60
117	88 : 166	132 : 122	136 : 118	46
118	210 : 200	214 : 196	196 : 214	52
119	208 : 157	206 : 159	186 : 179	49
120	231 : 123	174 : 180	198 : 156	44
125	206 : 224	240 : 190	216 : 214	50
131	186 : 200	234 : 152	187 : 199	52
133	176 : 96	192 : 80	180 : 92	34
135	200 : 140	168 : 172	136 : 204	60
139	189 : 180	249 : 120	204 : 165	45
140	165 : 243	198 : 210	204 : 204	50
145	150 : 78	38 : 194	177 : 51	22
50	120 : 153	135 : 138	273 : 0	0

Tabelle 3.2

Ergebnisse der Kreuzung der Mutanten rdt-101 bis rdt-145 und des Ausgangsstammes ade7-50 mit der atmungskompetenten auxotrophen Mutante ura1-171

rdt	ADE7 : ade7	URA1 : ura1	RDТ : rdt	% rdt
101	186 : 234	321 : 99	216 : 204	49
104	195 : 201	233 : 163	220 : 176	44
105	172 : 232	220 : 184	172 : 232	58
106	153 : 146	197 : 102	202 : 97	32
108	166 : 118	146 : 138	138 : 146	51
109	227 : 258	254 : 231	230 : 255	53
110	127 : 166	211 : 82	133 : 160	55
112	203 : 205	197 : 211	211 : 197	48
115	122 : 84	79 : 127	143 : 63	31
117	122 : 127	102 : 147	183 : 66	27
118	152 : 172	132 : 192	160 : 164	51
119	168 : 192	195 : 165	162 : 198	55
120	278 : 84	104 : 258	279 : 83	23
125	252 : 226	240 : 238	292 : 184	39
131	127 : 137	135 : 129	131 : 133	50
133	146 : 130	120 : 156	134 : 142	51
135	108 : 122	116 : 116	132 : 98	43
139	92 : 92	94 : 90	122 : 62	34
140	130 : 145	128 : 147	139 : 136	49
145	293 : 25	20 : 298	272 : 46	14
50	236 : 255	275 : 216	491 : 0	0

Tabelle 3.3

Ergebnisse der Kreuzungen der Mutanten rdt-148, rdt-149 und des Ausgangsstammes 972 h^- mit der atmungskompetenten auxotrophen Mutante ade6-210

rdt-	ADE6 : ade6	RDТ : rdt	% rdt
148	360 : 51	171 : 240	58
149	330 : 174	296 : 208	41
972	229 : 212	441 : 0	0

für das teils große Abweichen vom 2 : 2 - Verhältnis bei der Segregation der Kerngene kann durch reduzierte Lebens- oder Keimfähigkeit von Sporen mit bestimmter Kombination genetischer Marker herführen.

Die Zahl der rdt-Kolonien schwankt zwischen 14 % (Kreuzung rdt-145 h^- x ura1-171 h^+) und 60 % (Kreuzung rdt-115 h^- bzw. rdt-135 h^- x leu1-32 h^+).

Bei Kreuzungen mit der Mutante rdt-145 ergeben sich besonders wenige rdt-Kolonien (22 % bzw. 14 %). Dieser Sachverhalt wurde durch eine Tetradenanalyse genauer untersucht. Nach Auswertung von 15 Tetraden der Kombination rdt-145 h^- x ura1-171 h^+ stellte sich heraus, daß bei 12 Tetraden alle Sporen uracilbedürftig, atmungskompetent und vom Paarungstyp h^{90} waren; zwei weitere spalteten bezüglich des Paarungstyps 2 : 2 in h^+ - und h^{90} -Sporen. Nur eine Tetrade zeigte den korrekten mendelnden Erbgang für alle vier Marker h^-/h^+ , ura1, ade7 und rdt, wie es für sämtliche 15 Tetraden zu erwarten gewesen

wäre. Dieses Verhalten deutet eine nur äußerst geringe Fertilität der Mutante mit dem Kreuzungspartner *ura1-171* an: 14 der isolierten Tetraden waren durch Selbstung von stets in geringer Zahl vorhandenen h^{90} -Zellen mit ebensolchen oder mit h^{+} -Zellen des Stammes *ura1-171* entstanden. Dadurch erklärt sich das geringe Auftreten von temperatursensiblen atungsdefekten Sporen.

Im Zusammenhang mit diesen Kreuzungen ist ein Vergleich mit dem Saccharomyces-System angebracht. Dort sind drei verschiedene Typen mitochondrialer Defekt-Mutanten bekannt, die zur Atmungsdefizienz führen können:

ρ^{-} -Mutanten: mit stark veränderter mitDNS

ρ^{0} -Mutanten: mit fehlender extrahierbarer mitDNS (Faye et al., 1973)

mit^{-} -Mutanten: mitochondriale Punktmutanten (Tzagoloff et al., 1976)

Die beiden Deletions-Mutanten-Typen treten in manchen Stämmen bereits zu mehreren Prozenten/Zellgeneration auf; mitochondriale Punktmutanten dagegen sind wesentlich seltener.

Grundvoraussetzungen für den Nachweis einer dieser mitochondrialen Mutationsarten sind Plasmavermischung und Segregation der mitochondrialen Genome während mehrerer Generationen bis zum Erreichen des homoplasmatischen Zustands. Bei Schizosaccharomyces pombe verschmelzen die beiden Kreuzungspartner an einem der Enden zu einer bananenförmigen Zygote, die nach den beiden meiotischen Kernteilungen sofort sporuliert. Damit sind die vorstehend als Grundvoraussetzungen bezeichnete Plasmavermischung und Segregation in der Diploiden nicht verwirklicht. Eine mitochondriale Mutation zur Atmungsdefizienz kann auf dem Weg der Freisporanalyse somit nicht sicher nachgewiesen wer-

den. Wegen der sofortigen Sporulation würde eine 2 : 2 - Segregation zwischen atmungskompetenten und atmungsdefekten Nachkommen und damit ein karyotischer Erbgang vorgetäuscht werden.

Bisher wurde eine aufwendige Methode zur Herstellung der Diploiden angewendet, die auf der Komplementation zweier verschiedener Auxotrophien (möglichst Heteroallelen) beruht. Um diesen umständlichen Weg auszuschalten, wurden sporulationsdefekte Mutanten eingesetzt; bei ihnen sind Schritte zwischen Zygotenbildung und Reduktionsteilung blockiert.

3.2.3 Sporulationsdefekte Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe*

Ausgehend von einem homothallischen h^{90} -Stamm isolierten Bresch et al. (1968) mit Hilfe der in Material und Methoden beschriebenen Jodbedampfung 300 Mutanten, welche in der Meiose oder Sporulation blockiert sind. Für die Diploidisierungen der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten sind dabei allein die Mutanten von Bedeutung, die ihren genetischen Block unmittelbar vor Meiose I haben.

3.2.4 Diploidisierungen mit der Mutante *mei3-71*

Bei Verwendung des Stammes *mei3-71* zur Selektion Diploider muß die rezessive Mutation *mei3* in beide Kreuzungspartner eingekreuzt werden. Sie erlaubt Zellverschmelzung und Karyogamie der Partner, jedoch keine Meiose; die Zygoten entwickeln sich bei Überführung in frisches Medium zu diploiden Kolonien. Auf Glucose-Vollmedium bildet der Stamm *mei3-71 ade6-210* ein dunkelrotes, der Stamm *mei3-71 ade6-216* ein hellrotes Pigment. Die diploiden Kolonien h^-/h^+ *mei3-71/mei3-71 ade6-210/*

ade6-216 sind dagegen auf Grund interalleler Komplementation weiß und können auch auf Minimalmedium wachsen.

Um die allgemeinen Bedingungen für die Arbeit mit dieser Mutante herauszufinden, wurde eine Kinetik der Zygotenbildung erstellt.

Dazu wurden Zellsuspensionen spätlogarithmischer Flüssigkulturen der Stämme h^- mei3-71 ade6-210 und h^+ mei3-71 ade6-216 vermischt und jeweils 0,1 ml auf Schrägröhrchen mit Malz-Medium bzw. mit synthetischem Sporulationsmedium gegeben. Nach verschiedenen Zeiten wurde der Zellbelag abgenommen, in geeigneter Verdünnung auf Voll- und Minimalmedium plattiert und so die Zahl der Diploiden errechnet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Figur 3.4. Die Bildung Diploider wird auf synthetischem Sporulationsmedium schneller vollzogen; nach 30 Stunden ist das Maximum von 10 % Diploiden bezogen auf die Gesamtnachkommenschaft bereits erreicht, bei Kulturen auf Malzmedium dagegen erst etwa 10 Stunden später.

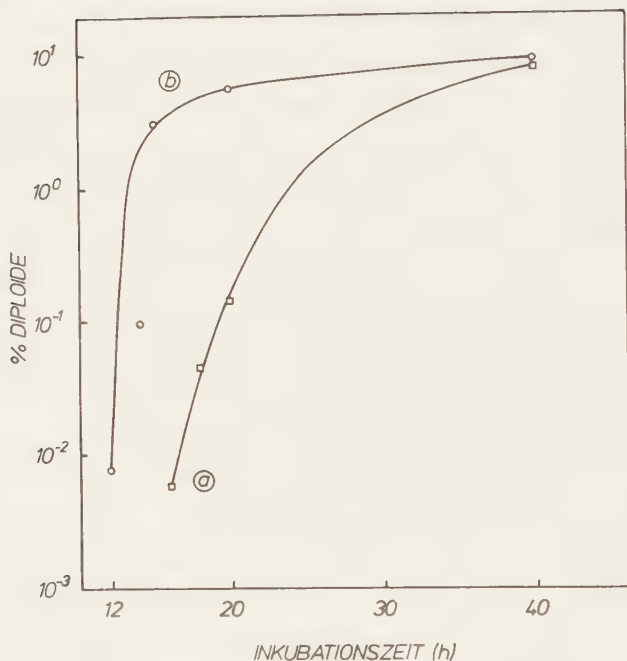
Wie schon erwähnt gestaltet sich die Verwendung der Mutante mei3-71 insofern schwierig, als das Gen mei3 rezessiv ist und daher in beiden Kreuzungspartnern vorhanden sein muß, um eine Sporulationsdefizienz zu bewirken. Zusätzlich muß das Gen ade7-50 mit dem Gen ade6-210 bzw. ade6-216 vertauscht werden, um die Selektion Diploider nach interalleler Komplementation zu ermöglichen. Diese Art der Diploidisierung wurde deshalb nur mit den beiden Mutanten rdt-117 und rdt-118 durchgeführt.

Die Ansätze

h^+ rdt-117 mei3-71 ade6-216 $\times$ h^- mei3-71 ade6-210

h^+ rdt-118 mei3-71 ade6-216 $\times$ h^- mei3-71 ade6-210

führten zu Diploiden, die sich als atemungskompetent erwiesen. Nach vegetativem Wachstum der Diploiden segregieren keine atemungsdefekten



Figur 3.4

Abhängigkeit der Bildung Diploider aus einem Gemisch von Zellen der Stämme h^- mei3-71 ade6-210 und h^+ mei3-71 ade6-216 auf Malz-Medium (a) bzw. synthetischem Sporulationsmedium (b) von der Dauer der Inkubationszeit

Zellen, neben der Freisporanalyse ein zusätzlicher Hinweis auf den chromosomalen Erbgang des Gens, das in mutiertem Zustand die temperatursensible Atmungsdefizienz bedingt.

3.2.5 Diploidisierungen mit der Mutante mei1-102

Die Mutante mei1-102 ist sehr nahe beim oder im Paarungstyplocus mutiert. Sie sporuliert gut mit h^+ -Stämmen, jedoch nicht mit h^- -Stämmen.

Diploidisierungen mit diesem Stamm wurden mit sämtlichen rdt-Mutanten durchgeführt. Von jeder Kreuzung wurden drei bis fünf Phloxin B-positive und Phloxin B-negative Kolonien vom Minimalmedium abisoliert und ihre Befähigung zur Koloniebildung bei 36° C auf Glycerin-Agar untersucht. Alle Diploiden erwiesen sich als atemungskompetent.

3.2.6 Haploidisierung als Mittel zur genetischen Kartierung

Zur Chromosomenkartierung bei Schizosaccharomyces pombe wird der meiotische Zyklus benutzt, d. h. die klassische Kreuzungsanalyse (Freispor- und Tetradenanalyse). Häufig wirkt sich dabei die bei Pilzen allgemein beobachtete hohe Rekombinationshäufigkeit weiter voneinander entfernt liegender Loci nachteilig aus. Bei freier Aufspaltung zweier Marker kann deshalb nicht ohne weiteres geschlossen werden, daß sie zu verschiedenen Kopplungsgruppen gehören. Einen Ausweg bietet das von Gutz (1966) und Flores da Cunha (1970) entwickelte Verfahren der genetischen Kartierung durch Haploidisierung. Bei der mitotischen Haploidisierung werden ganze Chromosomen verteilt; daneben auftretende Vorgänge von mitotischer Rekombination und Genkonversion sind in einer Größenordnung von weniger als 0,1 % (Gutz, 1971) und können daher weitgehend außer acht gelassen werden. Durch die Entdeckung, daß Fluorphenylalanin (FPA) die Rate mitotischer Haploidisierung erhöht (Marpurgo, 1961), wurde die Chromosomenkartierung vieler Pilze wesentlich vereinfacht und bei den Fungi

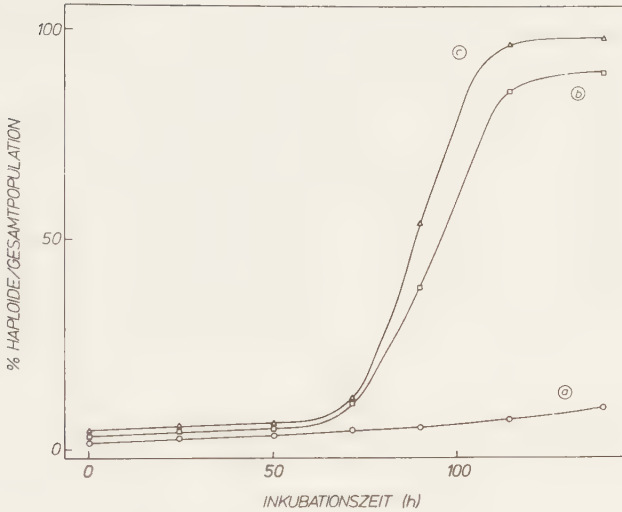
imperfecti überhaupt erst ermöglicht. Sowohl die spontane als auch die durch FPA induzierte mitotische Haploidisierung wird durch einen fortschreitenden Chromosomenverlust bis hin zur haploiden Konstitution erklärt.

3.2.7 Unterschiedliche Wirksamkeit von para-Fluorphenylalanin und meta-Fluorphenylalanin bei der Haploidisierung

Die ersten Haploidisierungsversuche bei Schizosaccharomyces pombe wurden mit pFPA ausgeführt (Gutz, 1966; Flores da Cunha, 1970). Später stellte sich heraus, daß mFPA weit weniger wachstumshemmend ist (Adondi und Heslot, 1970). In einem Vorversuch sollte deswegen die Wirksamkeit von pFPA und mFPA verglichen werden.

Dazu wurde synthetisches Minimal-Flüssigmedium, dem 0,12 % pFPA bzw. 0,05 % mFPA sowie 100 mg/l Adenin zugesetzt war, mit der stabilen Diploiden $h^-/h^- ade6-210/ade6-216$ beimpft und bei 25° C in Erlenmeyer-Kölbchen geschüttelt. Proben wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen und nach entsprechender Verdünnung auf Glucose-Agar plattiert. Die Auswertung der Haploidisierung kann visuell vorgenommen werden: diploide Kolonien sind auf Grund alleler Komplementation weißgefärbt, haploide bilden dagegen das für den *ade6*-Marker charakteristische rote Pigment aus (*ade6-210*-Kolonien erscheinen dunkelrot, *ade6-216*-Kolonien hellrot).

In Figur 3.5 ist die Abhängigkeit der induzierten Haploiden von der Dauer der Inkubationszeit in Haploidisierungs-Flüssigmedium aufgetragen. Daraus ist ersichtlich, daß sowohl durch pFPA als auch durch mFPA nach 5 Tagen das Maximum der Ausbeute an Haploiden erreicht ist: nur noch maximal 10 % aller vorhandenen Zellen sind diploid. Die

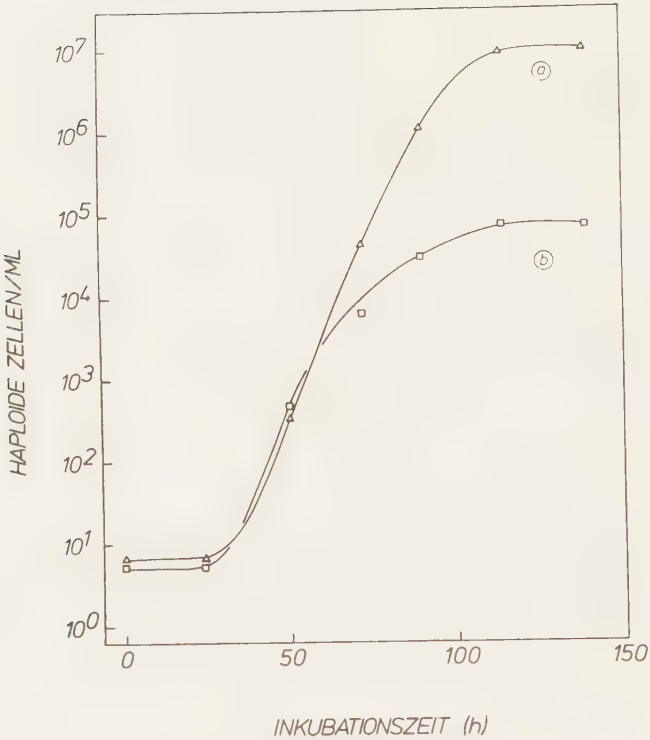


Figur 3.5

Abhängigkeit der entstehenden Haploiden aus der Diploiden h^-/h^- ade6-210/ade6-216 von der Dauer der Inkubationszeit in Haploidisierungs-Flüssigmedium (a) ohne Zusatz, (b) mit 0,12 % pFPA und (c) mit 0,05 % mFPA

Rate der spontan entstandenen Haploiden (Kontrolle ohne FPA) beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 10 % der Gesamtpopulation.

Um eine Abschätzung der Effizienz zwischen Haploidisierung mit pFPA und mFPA machen zu können, muß aber als zweiter Faktor noch die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit in den Medien mit den beiden Agentien berücksichtigt werden: pFPA wirkt weit wachstumshemmender als mFPA (Adondi und Heslot, 1970), was entsprechende Wachstumskurven zeigen. In der Figur 3.6 ist dieser Sachverhalt berücksichtigt. Die Kur-



Figur 3.6

Vergleich der absoluten Zunahme der Haploiden in einer anfangs einheitlich diploiden Zellpopulation ($h^-/h^- ade6-210/ade6-216$) bei Weiterzucht in Medium mit (a) 0,05 % mFPA und (b) 0,12 % pFPA

venpunkte wurden rechnerisch durch Multiplikation der Haploidisierungsrate (aus Figur 3.5) mit dem jeweiligen Titer der Zellkultur gewonnen. So ist ein Vergleich der absoluten Zunahme der Haploiden in der Zellpopulation möglich. Die Haploidisierungswirkung von mFPA übertrifft bei weitem die von pFPA: bei gleichem Anfangstiter von $2,5 \times 10^3$ Zellen/ml beträgt die Ausbeute an Haploiden nach 5 Tagen (d. h. bei stationärer Kultur) nach pFPA-Behandlung etwa 10^5 Zellen/ml, bei der Haploidisierung mit mFPA dagegen 10^7 Zellen/ml. Für die weiteren Haploidisierungen wurde deshalb grundsätzlich mFPA verwendet.

3.2.8 Haploidisierung der vom Stamm mei3-71 gewonnenen Diploiden

Wegen der schon angeführten Schwierigkeiten wurden vom Stamm mei3-71 Diploide nur von zwei rdt-Mutanten gewonnen. Sie erwiesen sich als atemungskompetent. Nach Haploidisierung mit mFPA ergeben sich die in Tabelle 3.4 eingetragenen Ergebnisse.

Tabelle 3.4

Haploidisierung der beiden durch den Stamm mei3-71 gewonnenen Diploiden: Übersicht der Genotypen von Diploiden und Haploiden

Diploide \ Haploide	RDT	rdt	RDT	rdt
	ade6-216	ade6-216	ade6-210	ade6-210
$\frac{h^+}{h^-}$ <u>rdt-117 mei3-71</u> <u>ade6-216</u> RDT mei3-71 ade6-210	21	42*	15*	27
$\frac{h^+}{h^-}$ <u>rdt-118 mei3-71</u> <u>ade6-216</u> RDT mei3-71 ade6-210	66	57*	28*	44

Das Fehlen von Neukombinanten-Typen unter den haploiden Produkten eines Haploidisierungs-Experiments zeigt die mitotische Koppelung der getesteten Marker (d. h. Lokalisierung auf demselben Chromosomenpaar). Auf die Tabelle 3.4 angewendet folgt daraus, daß das Gen für die temperatursensible Atmungsdefizienz bei den Mutanten rdt-117 und rdt-118 nicht mit dem Marker ade6-216 gekoppelt ist und somit nicht auf dem Chromosom III liegt. Andernfalls dürften Neukombinanten des Typs RDT ade6-216 bzw. rdt ade6-210 neben den Parentaltypen (*) in der beobachteten relativ hohen Anzahl nicht auftreten.

3.2.9 Haploidisierung der mit dem Stamm mei1-102 gewonnenen Diploiden. Versuch einer Kartierung der temperatursensiblen atmungsdefekten Mutanten

Wie schon unter 3.2.5 ausgeführt, wurden sämtliche rdt-Mutanten mit dem sporulationsdefekten Stamm mei1-102 in Kombination mit mehreren Auxotrophien diploidisiert. Die entstandenen Kolonien wuchsen nach Überetampeln durchweg auf Glycerin-Medium bei 36° C, waren also atmungskompetent. Damit kann die Mutation zur temperatursensiblen Atmungsdefizienz als rezessiv klassifiziert werden. Die gewonnenen Diploiden wurden haploidisiert und die Segregation bzw. Nicht-Segregation eines jeden auxotrophen Markers mit der temperatursensiblen Atmungsdefizienz überprüft.

Im einzelnen wurden die folgenden sporulationsdefekten Stämme verwendet: mei1-102 ade6-210

mei1-102 ade6-216

mei1-102 ura1-171 his3-237

mei1-102 his3-237 ade5-36

mei1-102 lys1-131 arg1-230

Die Marker *lys1* und *ura1* liegen auf Chromosom I, *ade7* und *his3* auf Chromosom II und *ade5*, *ade6* und *arg1* auf Chromosom III.

Nachfolgend werden zwei Beispiele angegeben, um die Art der Auswertung von Haploidisierungs-Experimenten zu veranschaulichen.

Im ersten Beispiel wird der Nachweis der Lokalisierung eines *rdt*-Markers auf dem Chromosom II geführt:

Der Kreuzungsansatz

h^- *rdt*-101 *ade7*-50 x *mei1*-102 *ura1*-171 *his3*-237

führt zu der atmungskompetenten Diploiden mit der Konstitution

Chr. I		Chr. II		
<u>URA1-171</u>	<u>h^-</u>	<u>HIS3-237</u>	<u>ade7-50</u>	Mutante <i>rdt</i> -101
<i>ura1</i> -171	<i>mei1</i> -102	<i>his3</i> -237	<i>ADE7</i> -50	<i>mei1</i> -Stamm

Sie ergab nach mFPA-Behandlung 235 Phloxin 8-negative Haploide, die auf Minimalmedium keine Kolonien bilden. Sie lassen sich auf Grund ihrer Genotypen in folgende 16 Klassen einteilen:

	<i>ura1</i>	<i>his3</i>	<i>ade7</i>	<i>rdt</i>	
1	+	+	+	+	0
2	+	+	+	-	0
3	+	+	-	+	0
4*	+	+	-	-	150
5	+	-	+	+	29
6	+	-	+	-	0
7	+	-	-	+	0
8	+	-	-	-	0
9	-	+	+	+	0
10	-	+	+	-	0
11	-	+	-	+	0
12	-	+	-	-	4
13*	-	-	+	+	52

	ura1	his3	ade7	rdt	
14	-	-	+	-	0
15	-	-	-	+	0
16	-	-	-	-	0
					235

* Parentaltypen

Sämtliche auftretenden atemungskompetenten Kolonien sind gleichzeitig histidinbedürftig, sämtliche temperatursensibel atemungsdefekten dagegen adeninabhängig.

Noch deutlicher werden die Aufspaltungsverhältnisse, wenn die Ergebnisse für jeden Marker einzeln betrachtet werden:

	ade7	ADE7
rdt	154*	0
RDT	0	81*

0 % Neukombinanten
(0 % - 2 %)

	ura1	URA1
rdt	4	150*
RDT	52*	29

14 % Neukombinanten
(10 % - 19 %)

	his3	HIS3
rdt	0	154*
RDT	81*	0

0 % Neukombinanten
(0 % - 2 %)

Die prozentuale Häufigkeit auftretender Neukombinanter nichtparentalen Genotyps ist angegeben. Die Mutungsgrenzen wurden nach Koller (1969) für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % errechnet. Aus der ersten und dritten Matrix ist ersichtlich, daß unter den Haploiden lediglich die Parentaltypen (*) rdt ade7 und RDT ADE7 bzw. rdt HIS3 und RDT his3 auftreten. Neukombinanten des rdt- mit dem ura1-Marker kommen dagegen mit einer Häufigkeit von 14 % vor, wie die zweite Matrix zeigt.

Es liegt also eindeutig eine Koppelung des rdt-Markers mit dem Gen ade7 auf Chromosom II vor, was bedeutet, daß das Gen für die Ausprägung der temperatursensiblen Atmungsdefizienz ebenfalls auf diesem Chromosom lokalisiert ist. Diese Aussage wird noch zusätzlich durch das ausschließlich gekoppelte Auftreten von Atmungskompetenz und Histidin-Bedürftigkeit bestätigt.

Im zweiten gewählten Beispiel sind derartig eindeutige Aussagen nicht möglich. Für die Mutante rdt-117 wurde durch Tabelle 3.4 in 3.2.8 ausgeschlossen, daß sich der in Frage stehende rdt-Mutationsort auf Chromosom III befindet.

Es wurde eine atmungskompetente Diploide der Konstitution

Chr. I	Chr. II			
<u>URA1-171</u>	<u>h⁻</u>	<u>HIS3-237</u>	<u>ade7-50</u>	Mutante rdt-117
ura1-171	mei1-102	his3-237	ADE7-50	mei1-Stamm

hergestellt. Nach Haploidisierung ergaben sich analog zum obigen Beispiel folgende Kombinationen von 104 Phloxin B-negativen Haploiden:

	ade7	ADE7
rdt	10*	14
RDT	38	42*

50 % Neukombinanten
(40 % - 60 %)

	ura1	URA1
rdt	12	8*
RDT	76*	4

15 % Neukombinanten
(9 % - 23 %)

	his2	HIS2
rdt	16	8*
RDT	40*	40

54 % Neukombinanten
(45 % - 64 %)

In allen drei Fällen wird der Wert 0 % nicht erreicht; deshalb muß eine Nicht-Kopplung des Gens für die temperatursensible Atmungsdefizienz mit einem der Marker angenommen und damit eine Lokalisierung auf den Chromosomen I oder II ausgeschlossen werden. Eine chromosomale Vererbung wurde aber durch Freisporanalyse nachgewiesen.

Die Methode der mitotischen Haploidisierung zur chromosomalen Lokalisierung von Genloci wurde für jeden Vertreter der in Tabelle 3.7 identifizierten Segmente an jeweils drei verschiedenen Diploiden angewendet. Eindeutig konnte nur der rdt-Locus der Mutante rdt-101 auf Chromosom II lokalisiert werden. Die theoretisch zu erwartenden Häufigkeiten der Genotypen unter den Nachkommen einer Zwei-Faktor-Kreuzung (1:1:1:1 bei Nicht-Koppelung; 1:1 bei Koppelung) können durch mitotisches Crossingover, Nondisjunction oder Selektion gegen gewisse Genotypen gestört werden, und es können trotz Koppelung Neukombinanten auftreten (Kohli, 1973; Kohli, 1976). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ist es sehr wahrscheinlich, daß die rdt-Loci der Mutan-

ten rdt-108 und rdt-148 auf Chromosom I liegen. Bei den entsprechenden Haploidisierungen ergaben sich 6 % bzw. 2 % Neukombinanten nicht-parentalen Genotyps.

3.2.10 Alleliebeziehungen temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten untereinander

Im Rahmen der genetischen Charakterisierungen der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten stellt sich auch die Frage nach der Zahl von Genorten, in welchen diese Mutationen vorkommen, und ob diese geclustert auftreten.

Bei Kreuzung zweier Mutanten läßt sich fehlende oder äußerst geringe Rekombinationshäufigkeit auf drei Arten erklären: es kann echte Homallelie vorliegen, die Mutationsorte können sich in ein und demselben Gen befinden oder aber sie liegen zwar eng benachbart, jedoch in zwei aneinandergrenzenden Genen. Weil zwischen diesen drei Möglichkeiten experimentell mit vertretbarem Aufwand nicht unterschieden werden kann, werden Mutanten, zwischen denen keine oder nur sehr wenige Rekombinanten gefunden wurden, zu einem Segment zusammengefaßt. Ergeben sich dagegen bei einer Kreuzung viele atmungskompetente Rekombinanten, so liegen Defekte in voneinander entfernten Genorten vor.

Temperatursensibel atmungsdefekte Mutanten wurden mit dem Wildtyp 975 h^+ rückgekreuzt und dadurch rdt-Mutanten des Paarungstyps h^+ isoliert. Durch kreuzweises Übereinanderstempeln von Ausstrichen der Mutanten des Paarungstyps h^- bzw. h^+ auf Malzmedium (siehe 2.3.11) und anschließendes Überstempeln auf Glycerin-Agar wurden sämtliche möglichen Kombinationen der rdt-Mutanten auf das Auftreten atmungskompetenter Rekombinanten überprüft. Bei diesem Vorgang werden etwa 10^6 Zellen jedes Partners überstempelt. Diese vermehren sich auf der

Malzplatte zu ca. 10^8 Zellen. Unter der Annahme von minimal 1 % kopulierender Zellen entstehen 10^6 Zygoten. Bei Kreuzungen innerhalb des *ade7*-Gens beispielsweise treten bis zu 0,14 % prototrophe Sporen auf. Legt man den *rdt*-Genen eine diesen Genen entsprechende Ausdehnung (gemessen in Rekombinationseinheiten) zu Grunde, so können mit dieser Methode intragene Rekombinationsereignisse erfaßt werden. Mutanten, die an den Überkreuzungsstellen auf der Glycerin-Agar-Platte nach Bebrütung bei 36°C wachstumsfrei bleiben, gehören zu demselben Segment, sodaß ihre Kreuzung ausschließlich *rdt*-Nachkommen liefert. Dagegen zeigen sämtliche Kreuzungen zwischen Mutanten, die mehr oder weniger unabhängig voneinander aufspaltende Gene für die temperatursensible Atmungsdefizienz tragen, ein intensives Wachstum auf Glycerin-Agar nach Inkubation bei 36°C . Die Verbindungsstücke zwischen den Überkreuzungsstellen dienen zur Abschätzung der Reversionsrate.

Zusätzlich zu diesem qualitativen Allelietest wurde von einem Teil der Mutanten noch eine quantitative genetische Analyse durchgeführt. Nach paarweiser Kreuzung der Mutanten untereinander und anschließendem Ausplattieren der entstandenen Ascosporen wurde die Zahl der atmungskompetenten Kolonien bestimmt.

Die Ergebnisse der Kreuzungsanalysen zeigen die Tabellen 3.5 und 3.6. Die Kreuzung *rdt*-101 und *rdt*-135 bringt keine RDT-Nachkommensporen; ebenso Kreuzungen innerhalb der Mutantengruppe *rdt*-108, *rdt*-109, *rdt*-110, *rdt*-118, *rdt*-119, *rdt*-131 und *rdt*-140. Diese Mutanten werden als zu einem Segment gehörig zusammengefaßt.

Aus diesen Untersuchungen kann eine genetische Klassifizierung der Mutanten durchgeführt und die Mutanten 15 Segmenten zugewiesen werden. Segment 1 wird durch zwei, Segment 5 durch sieben und die an-

		h^-																					
		101	104	105	106	108	109	110	112	115	117	118	119	120	125	131	133	135	139	140	145	148	148
h^+	101	●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	●	□	□	□	□	□
	104	●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	105		●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	106			●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	108				●	●	●	□	□	□	□	●	●	□	□	□	●	□	□	□	●	□	□
	109					●	●	□	□	□	□	●	●	□	□	□	●	□	□	□	●	□	□
	110						●	□	□	□	□	●	●	□	□	□	●	□	□	□	●	□	□
	112							●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	115								●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	117									●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	118										●	●	□	□	□	□	●	□	□	□	●	□	□
	119											●	□	□	□	□	●	□	□	□	●	□	□
	120												●	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	125													●	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	131														●	□	□	□	□	□	●	□	□
	133															●	□	□	□	□	□	□	□
	135																●	□	□	□	□	□	□
	139																	●	□	□	□	□	□
	140																		●	□	□	□	□
	145																			●	□	□	□
	148																				●	□	□
	149																					●	□

Tabelle 3.5

Ergebnisse der qualitativen Kreuzungsanalysen temperatursensibel
atmungsdefekter Mutanten untereinander

● keine atmungskompetenten Neukombinanten

□ atmungskompetente Neukombinanten

Tabelle 3.6

Ergebnisse der quantitativen Kreuzungsanalyse temperatursensibel at-
mungsdefekter Mutanten

	101	104	105	106	108	109	110	112	115	117	118	119	120	125	131	133	135	139	140
101	0	28	25	9	28	27	6	18	3	12	1	21	6	23	24	35	0	1	1
104		0	26	1	27	25	33	7	5	11	21	18	6	22	9	20	20	3	2
105			0	1	27	30	32	6	17	21	23	20	2	17	11	21	9	1	2
108					0	0	0	27	-	24	0	0	14	32	0	19	-	20	
109						0	0	19	11	20	0	0	11	8	0	24	1	17	
110							0	20	-	27	0	0	17	-	0	28	-	17	
115									0	20	13	23	17	19	36	18	18	7	1
117										0	20	22	8	22	31	20	20	18	2
118											0	0	2	24	0	6	14	10	
119												0	10	20	0	21	-	12	2
120													0	21	21	13	5	14	2
125															0	26	1	19	2
131																	0	8	10
133																		0	14
139																			11
140																			3

Die waagrechte Zeile symbolisiert die h^- -Stämme, die senkrechte Spalte die h^+ -Stämme. Angegeben sind die nach Kreuzung entstehenden atmungs-kompetenten Neukombinanten in Prozent der Gesamtkoloniezahl. Pro Kreuzung wurden zwischen 100 und 800 Nachkommenkolonien ausgewertet.

deren Segmente jeweils durch eine Mutante repräsentiert. Die Klassifizierung ist in der Tabelle 3.7 zusammengefaßt.

Tabelle 3.7

Zugehörigkeit der isolierten rdt-Mutanten zu den durch genetische Analyse identifizierten Segmenten

Segment	Mutanten
1	rdt-101, rdt-135
2	rdt-104
3	rdt-105
4	rdt-106
5	rdt-108, rdt-109, rdt-110, rdt-118, rdt-119, rdt-131, rdt-140
6	rdt-112
7	rdt-115
8	rdt-117
9	rdt-120
10	rdt-125
11	rdt-133
12	rdt-139
13	rdt-145
14	rdt-148
15	rdt-149

3.2.11 Komplementationsuntersuchungen temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten untereinander

Neben der Kreuzungsanalyse ist der Komplementationstest eine weitere wichtige Methode zur Bestimmung der Alleliebeziehungen zwischen Mutanten.

Nach Kreuzung der rdt-Mutanten in der h^+ -Konfiguration mit dem sporulationsdefekten Stamm mei1-102 ade6-210 konnten temperatursensibel atmungsdefekte Stämme der genetischen Konstitution mei1 ade6-210 selektiert werden, die zum Komplementationstest benutzt wurden. Auf diese Weise wurden Diploide aus sämtlichen Kombinationen hergestellt und diese auf temperatursensible Atmungsdefizienz bzw. Atmungskompetenz getestet.

Von Mutantenpaaren, die bereits durch den Rekombinationstest als nichtallel qualifiziert werden konnten (Tabellen 3.5 und 3.6), war zu erwarten, daß sie untereinander auch komplementieren. Bei der Untersuchung der in Tabelle 3.7 aufgeführten Mutantengruppen rdt-101, rdt-135 (Segment 1) und rdt-108, rdt-109, rdt-110, rdt-118, rdt-119, rdt-131, rdt-140 (Segment 5) stellte sich heraus, daß Diploide aus der Mutante rdt-131 in Kombination mit sämtlichen Mutanten der zweiten Gruppe atmungskompetent waren. Damit ergibt sich für diese Mutante eindeutig eine Sonderstellung innerhalb der Gruppe des Segments 5 in Tabelle 3.7. Auf Grund der Zahl der eingesetzten Zellen (10^6 von jedem Partner) und der im Verhältnis selten auftretenden atmungskompetenten Zellen, muß die Möglichkeit einer intragenen Komplementation der Mutante rdt-131 mit den Mutanten rdt-108, rdt-109, rdt-110, rdt-118, rdt-119 und rdt-140 angenommen werden.

3.2.12 Genetische Untersuchung einer nichtkonditionellen atmungsdefekten Rekombinante

Nach den in 3.2.10 durchgeführten paarweisen Kreuzungen der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten untereinander tritt unter den Nachkommen neben dem parental temperatursensibel atmungsdefekten Phänotyp und dem atmungskompetenten Neukombinantentyp auch noch eine weitere Klasse auf: nichtkonditionelle atmungsdefekte Kolonien. Sie wachsen auf Glycerin-Medium weder bei 23° C noch bei 36° C.

Uchida und Suda (1970) isolierten bei Saccharomyces cerevisiae eine diploide Mutante, die bei 30° C auf unvergärbarem Substrat (Na-Lactat-Medium) nicht wächst. Nach Rückkreuzung eines haploiden, temperatursensibel atmungsdefekten Segreganten mit einem atmungskompetenten Partner ergab sich - analog zu den obigen Kreuzungen der rdt-Mutanten von Schizosaccharomyces pombe - in der Nachkommenschaft ebenfalls ein neuer Typ von Segreganten: Kolonien, die auf Na-Lactat-Medium weder bei 20° C noch bei 30° C wuchsen. Die genetischen Untersuchungen zeigten dann, daß zwei Kerngene für diese Segregation verantwortlich waren, daß also eine Doppelmutante vorlag.

Von den durch Kreuzung entstandenen nichtkonditionell atmungsdefekten Kolonien von Schizosaccharomyces pombe wurde eine als Repräsentant ausgewählt. Dieser Kolonietyp trat mit einer Häufigkeit von etwa 35 % unter den Kreuzungsprodukten von rdt-120 x rdt-108 auf. Die temperatursensible Atmungsdefizienz wird bei diesen Kreuzungspartnern durch zwei nichtallele Loci bedingt (Tabelle 3.7). Wird die nichtkonditionell atmungsdefekte Rekombinante mit dem atmungskompetenten Wildtyp 975 h⁺ rückgekreuzt, so erhält man eine Aufspaltung in die folgenden Typen:

Phänotyp	Wachstum auf Glycerin-Agar bei 23° C	Wachstum auf Glycerin-Agar bei 36° C		x 975	
nichtkond. atmungs- defekt	-	-	ade7	10	9 %
	-	-	ADE7	14	
temperatur- sensibel	+	-	ade7	16	11 %
atm.def.	+	-	ADE7	13	
atmungs- kompetent	+	+	ade7	40	80 %
	+	+	ADE7	167	

Das erneute Auftreten temperatursensibel atmungsdefekter Kolonien außer den beiden Parentaltypen deutet an, daß es sich bei der nicht-konditionell atmungsdefekten Rekombinante um eine Mutante handelt, die zwar beide rdt-Mutationen enthält, jedoch die Befähigung zur Koloniebildung auf Glycerin-Medium bei beiden Temperaturen verloren hat.

Nichtkonditionell atmungsdefekte Doppelmutanten kommen in Häufigkeiten bis zu 35 % bei etwa einem Viertel der durchgeführten paarweisen Kreuzungen der Mutanten untereinander vor, jedoch ausnahmslos nur in Kombinationen von nichtallelen Loci, wie dies auch bei dem angeführten Beispiel der Fall ist.

3.2.13 Atmungskompetente Revertanten der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten

Eine Rückkehr zum atmungskompetenten Phänotyp kann genetisch auf zwei Weisen erreicht werden:

- a) durch Rückmutation: durch erneute Mutation des Mutationsortes erhält das betreffende Genprodukt wieder Wildtyp-Konformation
- b) durch zusätzliche Mutation(en) (Suppressormutationen): diese können innerhalb (intragen) oder außerhalb (extragen) des betreffenden Gens liegen. Theoretisch lassen sich Suppressormutationen durch Rekombination von dem ursprünglichen Mutationsort trennen. Die Auflösungsgegenauigkeit ist jedoch durch die Zahl der untersuchten Sporen beschränkt.

In allen zur Verfügung stehenden Stämmen temperatursensibel atmungsdefekter Mutanten traten spontan Atmungskompetente in von Mutante zu Mutante wechselnder Häufigkeit auf. Revertanten von 7 Mutanten wurden mit dem ebenfalls atmungskompetenten Wildtyp 975 rückgekreuzt. Die in Tabelle 3.8 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß unter 21 untersuchten spontanen Revertanten 19 nach Kreuzung mit dem Wildtyp wieder temperatursensibel atmungsdefekte Nachkommen-Sporen ergeben, deren Häufigkeit zwischen 6 % und 59 % schwankt. Deren relativ hohe Häufigkeit zeigt, daß es sich bei diesen Suppressormutationen um solche des extragenen Type handelt. Daß die Revertanten 104R2 und 104R3 echte Rück- bzw. intragene Suppressormutanten sind, kann wegen des kleinen Stichprobenumfangs nicht mit Bestimmtheit gesagt werden.

3.3 Physiologische Untersuchungen an den temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten

Im folgenden werden die temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten durch ihre physiologischen Eigenschaften charakterisiert: durch ihr Wachstumsverhalten bei verschiedenen Temperaturen, sowie durch ihre Reaktion auf Medium, welches das diagnostische Reagens 2,3,5-Triphe-

Tabelle 3.8

Ergebnisse der Rückkreuzung der atmungskompetenten Revertanten mit dem Wildtyp 975 h⁺

Revertanten- Nr.	Zahl der un- tersuchten Kolonien	davon rdt- Kolonien	% rdt- Kolonien
104R1	220	61	27,7
104R2	213	0	0
104R3	315	0	0
105R1	235	64 ^{a)}	27,2
105R2	177	72 ^{a)}	40,6
105R3	112	41 ^{a)}	36,6
106R1	88	22	25,0
106R2	112	17	15,1
106R3	207	14	6,7
108R1	257	152	59,1
108R2	99	19	19,1
108R3	186	74	39,7
109R1	178	36	20,2
109R2	214	51	23,8
109R3	246	120	48,7
110R1	144	46 ^{b)}	31,9
110R2	152	48 ^{b)}	31,5
110R3	124	26 ^{b)}	20,9
117R1	257	152	59,1
117R2	99	27	27,3
117R3	93	30	32,3

a) diese Kolonien sind allgemein atmungsdefekt

b) diese rdt-Kolonien wachsen auf Glycerin-Medium bei 23° C deutlich schlechter als die restlichen Kolonien

nyltetrazoliumchlorid bzw. Substanzen zur Erhöhung des osmotischen Drucks enthält.

3.3.1 Wachstumscharakteristika

Figur 3.7 und Figur 3.8 zeigen die Wachstumskurven des atemungskompetenten Ausgangsstammes ade7-50 bzw. der Mutante rdt-118 in Glycerin-Flüssigmedium.

Für den Wildtyp-Stamm beträgt bei einer Inkubationstemperatur von 23° C die Dauer der lag-Phase etwa 10 Stunden, die Generationsdauer während der logarithmischen Phase etwa 12 Stunden (Tabelle 3.9). Als Endtiter werden 1 bis 2 x 10⁷ Zellen/ml erreicht. Er ist stark von der Art der Belüftung des Mediums abhängig, liegt aber niedriger als bei Aufzucht in Glucose-Flüssigmedium (Endtiter dann etwa 5 x 10⁷ Zellen/ml). Für die Mutante rdt-118 ergab sich eine verlängerte lag-Phase von 20 Stunden (Figur 3.8). Die Generationsdauer bei 23° C Inkubationstemperatur und auch der Zelltitel in der stationären Phase gleichen etwa dem des Wildtyps (Tabelle 3.9). Bei Wechsel von 23° C zu 36° C Inkubationstemperatur tritt der temperatursensibel atemungs-

Tabelle 3.9

Generationsdauer von Wildtyp und temperatursensibel atemungsdefekter Mutante bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (Schüttelkulturen)

Stamm	Inkubationstemperatur	Generationszeit
ade7-50	23° C	12 h
	36° C	11 h
rdt-118	23° C	13 h
	36° C	360 h

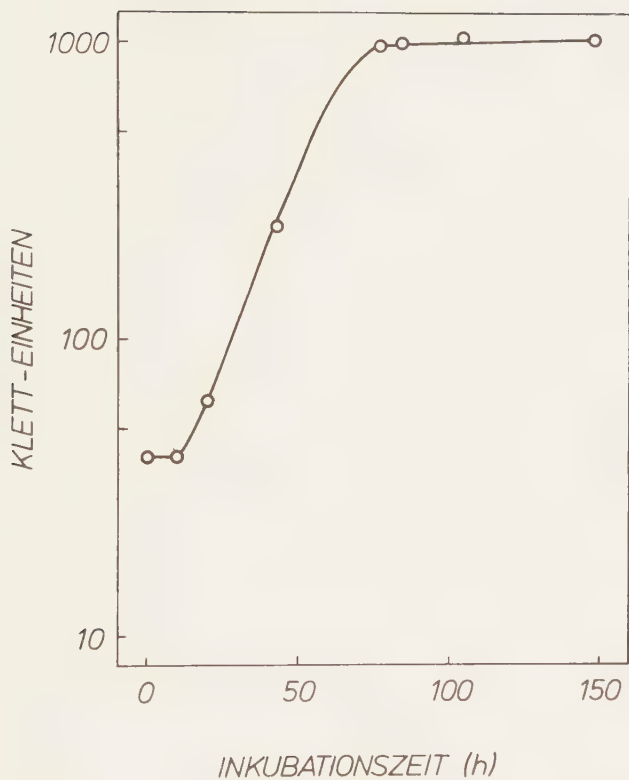
defekte Phänotyp in Erscheinung: die Mutante stellt ihre Vermehrung ein bzw. reduziert sie in sehr starkem Maße. Die Generationszeit nimmt um fast das 30fache zu und beträgt dann 360 Stunden. Im Gegensatz zum Temperaturwechsel auf Festmedium wird das Wachstum also nicht völlig eingestellt.

Daß die Lebensfähigkeit der Zellen bei 36° C erhalten bleibt, kann durch Rückgang zur permissiven Temperatur nachgewiesen werden (Figur 3.8): der Zelltitel steigt wieder an, bis das Plateau der stationären Phase erreicht ist. Bei Langzeitversuchen wurde festgestellt, daß erst nach etwa 500 Stunden Aufzucht bei 36° C eine Abnahme der Fähigkeit, Kolonien zu bilden, zu beobachten ist.

3.3.2 Prüfung der Mutanten auf ihre Befähigung zur Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu Triphenylformazan

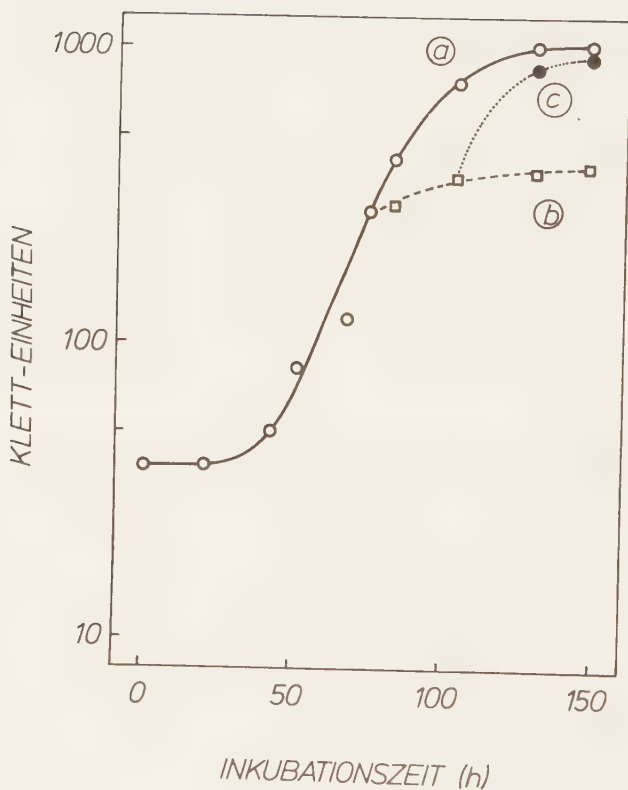
Bachofen et al. (1972) beobachteten bei Schizosaccharomyces pombe und Saccharomyces cerevisiae eine starke Wachstumshemmung atemungskompetenter Zellen durch TTC; die Wirkung sowohl auf chromosomale als auch mitochondriale atemungsdefekte Mutanten dagegen war nur gering. Das farblose, wasserlösliche TTC wird von den atemungskompetenten Hefezellen zum fast unlöslichen, intensiv roten luftbeständigen Triphenylformazan reduziert. Diese Reaktion kann deshalb dazu benutzt werden, um die Intaktheit der Atmungskette der Mutanten zu überprüfen.

Die temperatursensibel atemungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe wurden mit TTC-haltigem Weichagar überschichtet (Ogur et al., 1957). Eine Plattenserie wurde bei 23° C, die zweite bei 36° C inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Kolonien mit einer Lösung aus



Figur 3.7

Vermehrung der Zellen des atmungskompetenten Stammes *ada7-50* von *Schizosaccharomyces pombe* in Glycerin-Flüssigmedium bei 23° C bestimmt als Zunahme der Klett-Einheiten
5 ml Schüttelkultur in Klett-Gefäßen. Messung mit Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter (Filter Nr. 54)



Figur 3.8

Vermehrung der Zellen der temperatursensibel atmungsdefekten Mutante rdt-118 von *Schizosaccharomyces pombe* in Glycerin-Flüssigmedium bestimmt als Zunahme der Klett-Einheiten bei a) 23° C; b) Weiterbebrütung dieser Kultur bei 36° C; c) erneuter Rückkehr zu 23° C (genaue Erklärungen siehe 3.3.1)

Andere Bedingungen wie in Figur 3.7

1,5 % Agar, 0,067 M Phosphatpuffer pH 7 und 0,1 % TTC überschichtet.

Atmende Zellen färben sich dadurch in wenigen Stunden rot an.

Bei sämtlichen Ausstrichen wurde nach zwei Stunden eine intensive Rotfärbung beobachtet. Es ist damit nachgewiesen, daß sämtliche Mutanten auch nach Aufzucht bei 36° C noch atmen. Dies steht in Übereinstimmung mit den bei den Mutanten gewonnenen Wachstumskurven in Flüssigmedium (Figur 3.8): die Mutante stellt ihre Vermehrung in Glycerin-Medium nicht ganz ein, sondern reduziert sie lediglich stark.

3.3.3 Osmotische Heilbarkeit

Hawthorne und Friis (1964) fanden, daß bestimmte auxotrophe Mutanten von Saccharomyces cerevisiae in Abwesenheit des benötigten Wachstumsfaktors wachsen können, wenn der osmotische Druck des Mediums erhöht wird. Diese Mutanten werden als "osmotisch heilbar" (osmotic remedial) bezeichnet. Eine Vielzahl von Verbindungen, einschließlich Äthylenglycol, Glycerin, Glucose, KCl, NaCl, Sorbitol und Mannitol, können diesen osmotischen Heilungseffekt bewirken. Viele der osmotisch heilbaren Mutanten sind auch temperatursensibel, sodaß sich umgekehrt die Frage aufwirft, ob sich unter den im vorliegenden beschriebenen temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten auch osmotisch heilbare befinden.

Die isolierten temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten von Schizosaccharomyces pombe wurden bezüglich osmotischer Heilbarkeit durch mehrere Substanzen untersucht: nach Ausstrich der Mutanten auf Glucose-Medium, das mit den entsprechenden osmotisch heilenden Verbindungen supplementiert war, wurden die Platten dann bei 23° C inkubiert, bis Kolonien gewachsen waren, und diese auf ebenfalls supple-

Tabelle 3.10

Überblick über die osmotisch heilbaren, temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten

Wachstum (+) oder Nicht-Wachstum (-) auf Glycerin-Medium mit Sorbitol bzw. Mannitol bei verschiedenen Temperaturen

rdt	+ 0.1 M Sorbitol		+ 0.25 M Sorbitol		+ 0.5 M Sorbitol		+ 0.75 M Sorbitol		+ 1 M Sorbitol	
	23°	36°	23°	36°	23°	36°	23°	36°	23°	36°
105	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
117	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
139	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
145	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

rdt	+ 0.25 M Mannitol		+ 0.5 M Mannitol		+ 1 M Mannitol	
	23°	36°	23°	36°	23°	36°
105	+	-	+	-	+	+
117	+	-	+	+	+	+
120	+	-	+	+	+	+

mentiertes Glycerin-Medium gestempelt.

Insgesamt erstreckte sich die Überprüfung auf fünf osmotisch heilende Substanzen, von denen sich zwei (Kaliumchlorid und Natriumchlorid) als wachstumshemmend erwiesen und eine weitere (Äthylenglycol) keine Effekte hatte.

Durch Gabe von Sorbitol bzw. Mannitol konnte dagegen bei fünf Mutanten eine Heilung erzielt werden, d. h. Wachstum bei 36° C auf Glycerin-Medium war möglich. Ein Überblick über diese Mutanten wird in der Tabelle 3.10 gegeben.

3.4 Biochemische Untersuchungen

Neben den genetischen und physiologischen Charakterisierungen wurden auch biochemische Untersuchungen an den temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten durchgeführt, um so eventuelle Defekte in der Atmungskette lokalisieren zu können.

3.4.1 Tests für die enzymatische Aktivität der Atmungskette

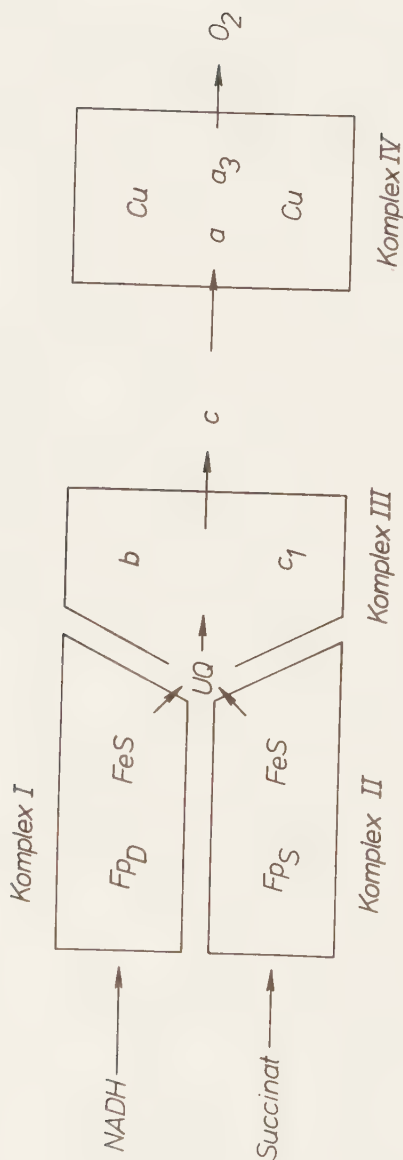
Die enzymatische Aktivität der Atmungskette oder einzelner Abschnitte der Atmungskette kann durch optische Methoden ermittelt werden. Das Prinzip dieser Enzymtests besteht darin, die Umsetzung zugegebener Substrate (NADH, Succinat, reduziertes Cytochrom c) oder die Reduktion zugegebener Akzeptoren (oxidiertes Cytochrom c) zu messen. Die Reduktion von oxidiertem Cytochrom c lässt sich durch einen optischen Test verfolgen, da sich der reduzierte und oxidierte Zustand dieser Substanz durch die Höhe der jeweiligen Absorptionsmaxima unterscheidet.

Die Aktivitäten der folgenden Atmungskettenenzyme der Ausgangsstämme und aller Mutanten wurde untersucht:

- a) NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase (Komplexe I und III)
- b) Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase (Komplexe II und III)
- c) Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase + PMS (Komplex II)
- d) Cytochromoxidase (Komplex IV)

Eine vereinfachte Darstellung der Komplexe der Atmungskette ist in Figur 3.9 gegeben.

Die Aktivität der Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase wird ohne und mit Phenazinmethosulfat (PMS) bestimmt. PMS ist dabei ein Elektronenüberträger zwischen der Succinatdehydrogenase und dem Cytochrom



Figur 3.9

Stark vereinfachtes Schema der vier Komplexe der Atmungskette nach der Modellvorstellung von Green
 Fp_D = Flavoprotein der NADH-Dehydrogenase, Fp_S = Flavoprotein der Succinat-Dehydrogenase
 FeS = Schwefeleisenprotein, UQ = Coenzym Q, a, a₃, b, c, c₁ = Cytochrome, Cu = geb. Kupfer

c. Coenzym Q und Komplex III werden bei dieser Reaktion umgangen; dadurch ist eine Untersuchung von Komplex II allein möglich.

Die Aktivität von Komplex IV bestimmt die Geschwindigkeit der Oxidation von reduziertem Cytochrom c.

Außerdem wird bei den ersten drei Tests die Hemmbarkeit durch das Antibiotikum Antimycin, im vierten die durch KCN untersucht.

3.4.2 Ergebnisse der enzymatischen Tests

Die Enzymtests wurden bei jedem Stamm und für jeden der vier Tests auf drei verschiedene Arten durchgeführt: einmal wurden die Zellen nach Aufzucht bei 23° C in Glycerin-Flüssigmedium bei einem Titer von etwa $1,5 \times 10^8$ Zellen/ml (späte logarithmische Phase) geerntet. Nach Präparation der mitochondrialen Partikel wurden die Enzymaktivitäten bei den Temperaturen 23° C und 36° C gemessen. Erhöhung der Temperatur führt im physiologischen Bereich bei der Mehrzahl der Enzyme zur Steigerung ihrer Aktivität. Durch Vergleich der bei den beiden Temperaturen erhaltenen Meßergebnisse kann festgestellt werden, ob das geprüfte Enzym temperatursensibel, also direkt schaltbar ist. Bei den Wildtypen nimmt die Enzymaktivität der NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase und der Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase nach der Temperaturerhöhung von 23° C auf 36° C auf etwa das Anderthalbfache zu (Tabelle 3.14). Dieses Verhalten zeigen auch die meisten Mutanten (Tabellen 3.11 bis 3.13). Die Mutante rdt-101 bildet eine Ausnahme dadurch, daß sie bei 36° C eine Verdreifachung der Enzymaktivität aufweist. Die Mutanten rdt-104, rdt-110, rdt-118, rdt-133, rdt-139 und rdt-149 dagegen sind bei 36° C-Meßtemperatur in zumindest einer der beiden in Frage stehenden Aktivitäten signifikant vermindert (meist auf etwa die Hälfte der 23° C-Aktivität).

Die Aktivität der Cytochromoxidase nimmt beim Wildtyp durch Temperaturerhöhung nicht signifikant zu. Beim Vergleich der gemessenen Enzymaktivitäten bei 23° C und 36° C können die Mutanten wieder in drei Klassen eingeteilt werden: bei den meisten Mutanten bleibt die Aktivität gleich (Beispiele: rdt-108, rdt-109, rdt-110, rdt-115, rdt-119, rdt-131, rdt-133, rdt-135 und rdt-140). Die Mutante rdt-101 ist ein Repräsentant für starke Erhöhung der Enzymaktivität und schließlich die Mutante rdt-105 für signifikante Abnahme der Cytochromoxidase-Aktivität.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Mutanten ebenfalls bei 23° C in Glycerin-Flüssigkultur angezogen, jedoch während der log-Phase der nichtpermissiven Temperatur von 36° C ausgesetzt. Dadurch sollte den Zellen Gelegenheit geboten werden, den temperatursensibel atemungsdefekten Phänotyp auszubilden. Die Zellen reduzieren nach dem Temperaturwechsel ihr Wachstum sehr stark; die Generationszeit nimmt um das 30fache zu (Figur 3.8; Tabelle 3.9). Nach 48 Stunden werden die Zellen geerntet und präpariert. Die Enzymaktivitäten der gewonnenen mitochondrialen Strukturen wurden bei 36° C untersucht.

Beim Vergleich mit den Enzymaktivitäten des Wildtyps (Tabelle 3.14) fällt auf, daß diese für die NADH - bzw. Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase auf das 3- bis 4-fache der Aktivität bei 23° C-Aufzucht- und 23° C-Meßtemperatur ansteigt; beim Stamm 972 h⁻ verdoppelt sich die Cytochromoxidase-Aktivität, beim Stamm ade7-50 h⁻ vermindert sie sich dagegen.

Die Mutanten rdt-104 und rdt-105 zeigen bei 36° C-Aufzucht- und Meßtemperatur für die NADH - und Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase eine 2- bis 3-fache Erhöhung der Aktivität des Wildtyps. Von den übrigen Mutanten werden Wildtyp- oder nur reduzierte Wildtyp-Aktivität

Tabelle 3.11

Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen der NADH - Cytochrom c - Oxi-doreduktase (Komplex I und III) eingetragen in % der Enzymaktivitäten der Ausgangsstämme ads7-50 bzw. 972

*Aufzuchtstemperatur **Meßtemperatur

rdt	*23° C **23° C	*23° C **36° C	*36° C **36° C	Antimycin- Hemmung
101	93	199	101	+
104	157	79	196	+
105	104	134	70	+
106	130	133	62	+
108	92	93	71	+
109	12	12	14	+
110	19	8	24	+
112	65	36	55	+
115	239	190	147	+
117	93	115	67	+
118	57	27	31	+
119	140	120	60	+
120	65	82	82	+
125	174	155	100	+
131	13	12	29	+
133	38	17	12	+
135	294	189	312	+
139	25	11	15	+
140	56	37	20	+
145	36	24	20	+
148	104	100	73	+
149	123	69	-	+

Tabelle 3.12

Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen der Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase (Komplex II und III) eingetragen in % der Enzymaktivitäten der Ausgangsstämme ade7-50 bzw. 972

*Aufzuchtstemperatur **Meßtemperatur

rdt	*23° C **23° C	*23° C **36° C	*36° C **36° C	Antimycin- Hemmung	PMS- Steig.
101	105	217	107	+	+
104	253	144	182	+	+
105	159	217	74	+	+
106	147	224	62	+	+
108	183	195	59	+	+
109	51	15	30	+	+
110	36	12	13	+	+++
112	96	55	56	+	+
115	345	409	87	+	+
117	117	150	55	+	+
118	130	67	31	+	+
119	150	192	52	+	+
120	67	70	42	+	+
125	196	325	73	+	+
131	67	16	36	+	+
133	43	27	-	+	+
135	288	179	269	+	+
139	40	14	9	+	+
140	163	109	35	+	+
145	49	39	12	+	+
148	122	140	60	+	+
149	106	95	-	+	+

Tabelle 3.13

Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen der Cytochromoxidase (Komplex IV) eingetragen in % der Enzymaktivitäten der Ausgangsstämme ade7-50 bzw. 972

*Aufzuchtstemperatur **Meßtemperatur

rdt	*23° C **23° C	*23° C **36° C	*36° C **36° C	KCN- Hemmung
101	33	126	352	+
104	80	127	337	+
105	92	18	97	+
106	63	100	208	+
108	48	53	112	+
109	34	21	140	+
110	17	16	74	+
112	32	14	172	+
115	88	92	75	+
117	61	83	78	+
118	37	21	67	+
119	46	50	124	+
120	66	37	101	+
125	70	109	102	+
131	23	20	56	+
133	19	24	1	+
135	25	17	99	+
139	26	44	41	+
140	39	35	58	+
145	80	105	55	+
148	95	130	137	+
149	86	122	-	+

Tabelle 3.14

Enzymaktivitäten der beiden Ausgangsstämme ade7-50 bzw. 972 h⁻ bei verschiedenen *Aufzuchs- und **Meßtemperaturen

	Stamm	*23° C **23° C spez.Akt.	*23° C **36° C spez.Akt.	*36° C **36° C spez.Akt.
NADH-Cytochrom c-Oxidoreduktase	50	0,18 100 %	0,25 139 %	0,59 317 %
	972	0,29 100 %	0,54 181 %	1,04 351 %
Succinat-Cytochrom c-Oxidoreduktase	50	0,11 100 %	0,13 123 %	0,48 430 %
	972	0,22 100 %	0,33 150 %	0,55 251 %
Cytochromoxidase	50	28,9 100 %	27,5 95 %	18,5 64 %
	972	19,5 100 %	22,3 114 %	38,9 199 %

erreicht. Die Cytochromoxidase-Aktivität bewegt sich in einem Spektrum von 352 % (rdt-101) bis 1 % (rdt-133) der Aktivität des Wildtyps.

4 Besprechung der Ergebnisse

Trotz umfangreicher Bemühungen konnten bisher von der petite negativen Spalthefe Schizosaccharomyces pombe keine mitochondrialen Mutanten des ρ^- -Typs isoliert werden (Heslot et al., 1970; Schwab et al., 1971; Wolf et al., 1971). Von Weislogel und Butow (1970) bzw. von Handwerker et al. (1973) konnte bei Saccharomyces cerevisiae gezeigt werden, daß sowohl chromosomale als auch mitochondriale Mutationen existieren, die sekundär zur Bildung von ρ^- -Zellen führen. Selbst für den Fall, daß ρ^- - oder ρ^0 -Mutanten bei petite negativen Hefen nicht lebensfähig sind, ist immerhin noch folgender Phänotyp einer konditionellen Mutante denkbar: bei der erlaubten Temperatur von 23° C wächst die Mutante auf glycerinhaltigem Medium, der Übergang zur nichtpermissiven Temperatur von 36° C wirkt sich dagegen für die Zellen durch Veränderung oder Verlust ihrer mitDNS - entsprechend dem ρ^- - oder ρ^0 -Typ bei Saccharomyces cerevisiae - letal aus. Mutanten dieses konditionellen Typs haben bei Schizosaccharomyces pombe verschiedene Vorteile für experimentelle Arbeiten, die hier nur stichwortartig angeführt seien: bei der erlaubten Temperatur ist das mutativ betroffene Enzym voll funktionsfähig, bei unerlaubter Temperatur wird es in seiner Funktion eingeschränkt. Dadurch wird das Studium der Kinetik von Funktion zur Nichtfunktion von Enzymen ermöglicht. - Um Glucose-Repression zu vermeiden, kann Schizosaccharomyces pombe nicht wie Saccharomyces cerevisiae auf Galactose-Medium gezüchtet werden, weil sie diesen Zucker nicht abbaut. Bei konditionell atmungsdefekten Mutanten besteht durch Umschaltung der Temperatur die Möglichkeit, Effekte der Glucose-Repression auszuschalten. - Ein weiterer Vorteil wäre der Wegfall der störenden, spontan entstehenden ρ^- -Zellen.

Es war deshalb Ziel der vorliegenden Arbeit, temperatursensibel atmungsdefekte Mutanten von Schizosaccharomyces pombe zu isolieren. Diese sollten dann genetisch, physiologisch und biochemisch näher charakterisiert werden.

Die genetischen Untersuchungen sollten die Frage klären, ob die zur temperatursensiblen Atmungsdefizienz führende Mutation in der Kern- oder der mitDNS lokalisiert ist.

Wie schon in 3.2.2 dargestellt wurde, kann durch die Freisporanalyse wegen der sofortigen Sporulation der Zygoten und der fehlenden Plasmavermischung in der Diploiden keine Entscheidung über chromosomalen oder mitochondrialen Erbgang der Mutation getroffen werden. Auch bei mitochondrialem Erbgang der Mutation würde sich nämlich auf Grund des Auftretens von 4:0-, 0:4-, 3:1- und 1:3-Tetraden zahlenmäßig eine 2:2-Aufspaltung der Meioseprodukte ergeben und dadurch ein Mendelscher Erbgang vorgetäuscht werden.

Es müssen deshalb Diploide hergestellt werden, um gegebenenfalls eine ablaufende Segregation beobachten zu können. Wildtyp-Diploide, die für den Paarungstyp heterozygot sind, bleiben bei Schizosaccharomyces pombe aber nicht stabil (Leupold, 1970). Durch Kreuzung der Mutante mei1 mit den temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten können stabile Diploide erzeugt und durch Komplementation auxotropher Marker selektiert werden. Die synthetisierten, bezüglich der temperatursensiblen Atmungsdefizienz heterozygoten Diploiden und ihre Nachkommen erweisen sich als atmungskompetent, was einen rezessiven Erbgang dieser Mutation andeutet.

Zusammenfassend ist also festzustellen, daß die temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten genau wie die schon früher von Wolf et al. (1971) isolierten allgemein atmungsdefekten Mutanten einen karyoti-

schen Erbgang besitzen.

In qualitativen und quantitativen Untersuchungen wurde die Zahl der Mutationsorte zur temperatursensiblen Atmungsdefizienz abgeschätzt. Von eng gekoppelten Loci konnte bei diesem Verfahren nicht unterschieden werden, ob es sich um Allele eines Gens oder um zwei verschiedene, eng gekoppelte Gene handelt. Es wurde daher eine Aufteilung in 15 Segmente vorgenommen.

Innerhalb des Segments 5 (rdt-108, rdt-109, rdt-110, rdt-118, rdt-119, rdt-131 und rdt-140) nimmt die Mutante rdt-131 eine Sonderstellung ein: sie bildet nach Kreuzung mit den restlichen Mutanten des Segments keine atmungskompetenten Rekombinanten, im Komplementationstest mit den gleichen Mutanten jedoch atmungskompetente Diploide. Damit könnte es sich beim Segment 5 um einen einzigen Genlocus, bestehend aus einem oder mehreren Cistrons handeln. Die Anzahl der vorgenommenen Kreuzungen wäre dann nicht ausreichend gewesen, um zum Wildtyp führende Rekombinationen zwischen zwei Mutanten nachzuweisen. Komplementation dagegen wäre in jedem Falle zu erwarten. Sie konnte ja auch beobachtet werden.

Der Versuch, mittels mitotischer Haploidisierung von Diploiden die Marker für die Ausprägung der temperatursensiblen Atmungsdefizienz auf einer der drei bisher bekannten Kopplungsgruppen zu lokalisieren, ergab die eindeutige Festlegung eines rdt-Markers auf das Chromosom II. Mitotische Haploidisierung sollte zwar ohne Austausch zwischen homologen Chromosomen erfolgen (Gutz, 1966; Flores da Cunha, 1970), was bedingt, daß Marker auf derselben Kopplungsgruppe zusammen segregieren. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte es sich jedoch, daß

relativ häufig bei den Mitosen Unregelmäßigkeiten vorkommen (mitotische Rekombination), sodaß trotz wahrscheinlicher Koppelung Neukombinanten durch Rekombinationseignisse auftreten. Außerdem ist bekannt, daß die Kombination bestimmter genetischer Marker in einer Haploiden die Lebensfähigkeit stark herabsetzt (Kohli, 1976). Diese beiden Gründe bedingen die Unzulänglichkeit der mitotischen Haploidisierung. Zur methodischen Verbesserung könnte die Diploidisierung mit einer Reihe von Stämmen versucht werden, deren Marker näher an dem zu lokalisierenden rdt-Gen liegen. Die o. a. Fehler bei den ablaufenden Mitosen während der Haploidisierung könnten durch einen geringen Abstand von Test- und Kontrollmarker auf ein Minimum reduziert werden.

Die Zahl von drei genetisch bestimmten Chromosomen gibt nur eine untere Grenze an. Die Fortsetzung der Kartierungsversuche wird wahrscheinlich zur Auffindung weiterer Chromosomen führen. Gegenwärtig sind schätzungsweise erst ein Drittel der bekannten Gene von Schizosaccharomyces pombe kartiert (Gutz et al., 1974). Somit könnten die rdt-Mutationen, bei denen keine Kopplung mit einem der drei bis jetzt kartierten Chromosomen nachzuweisen ist (beispielsweise rdt-117), mit ein Weg zur Identifizierung weiterer Koppelungsgruppen sein. McCully und Robinow (1971) und Fischer et al. (1975) beobachteten in gefärbten Zellen von Schizosaccharomyces pombe im Interphase-Kern bis zu 8 Chromatin-Stäbchen, von denen sie annehmen, daß es Chromosomen sind.

Beim Vergleich von Wachstumskurven des atemungskompetenten Wildtyps mit denen von temperatursensibel atemungsdefekten Mutanten fällt auf, daß bei Aufzucht in Glycerin-Flüssigmedium bei 23° C die Dauer der lag-Phase verdoppelt ist. Die Mutante benötigt also eine verlängerte

Zeit der Anpassung an das Medium. Ein Unterschied in der Dauer der Generationszeit konnte bei erlaubter Temperatur nicht festgestellt werden. Bei Übergang zu 36° verlangsamt sich das Wachstum der Mutanten sehr stark; die Generationszeit steigt auf das 30fache an, ein völliges Einstellen des Wachstums erfolgt jedoch nicht. Dies steht in Übereinstimmung mit einem anderen Prüfverfahren für den Nachweis von Atmung bei Zellen: mit der TTC-overlay-Technik nach Ogur et al. (1957) konnte bei sämtlichen Mutanten nachgewiesen werden, daß sie auch nach Aufzucht bei 36° C noch atmen.

Durch Veränderung des physiologischen Milieus können Kolonien gewonnen werden, die phänotypisch Wildtyp sind. Die Umwandlung des Mutantenphänotyps hat in diesem Fall keine genetische Ursache. Solche Veränderungen können durch Erhöhung des osmotischen Drucks im Medium erreicht werden. Bei entsprechenden Versuchen konnte bei 5 Mutanten durch Gabe von Sorbitol bzw. Mannitol eine osmotische Heilung erzielt werden, d. h. Wachstum auf Glycerin-Medium bei 36° C mit Supplementierung dieser Substanzen war wieder möglich.

Die Eigenschaft der osmotischen Heilbarkeit zeigt eine positive Korrelation mit der interallelen Komplementation (Hawthorne und Friis, 1964). Enzyme, welche allele Komplementation zeigen, sind wahrscheinlich aus mehr als einer Polypeptidkette zusammengesetzt (Fincham und Coddington, 1963); deswegen könnte es möglich sein, daß die osmotisch heilenden Bedingungen speziell für den Polymerisations-Schritt benötigt werden und daß das Enzym stabil ist, sobald die Vereinigung der Untereinheiten beendet ist. Andererseits sind aber auch Einwirkungen auf die Tertiärstruktur des entstehenden Polypeptids denkbar und eine daraus resultierende Erleichterung der Synthese des entstehenden Genprodukts oder eine Erhöhung seiner Aktivität. Aus dem

Verhalten der Mutanten gegen Veränderungen der Temperatur und des osmotischen Drucks kann auch auf den Typ der Mutation geschlossen werden: Temperatursensibilität ist ein typisches Charakteristikum für missense-Mutationen (Edgar et al., 1964); bei temperatursensiblen Mutanten bewirkt der mutativ bedingte Aminosäureaustausch die Temperatursensibilität des betreffenden Genprodukts. Auch solche osmotisch heilbaren Mutanten werden als missense-Mutanten interpretiert, deren Protein-Quartärstruktur als Konsequenz einer einzelnen Aminosäure-Substitution verändert ist. Unterstützt wird diese Behauptung neben dem häufig gemeinsamen Vorkommen von Temperatursensibilität und osmotischer Heilbarkeit durch einen weiteren Befund (Hawthorne und Friis, 1964): osmotische Heilbarkeit und Supprimierbarkeit scheinen sich gegenseitig ausschließende Eigenschaften zu sein (Hawthorne und Mortimer, 1963). Von Allelen, die durch Suppressoren beeinflusst werden können, wird postuliert, daß sie in den meisten Fällen nonsense-Mutationen sind. Es sind dies Genmutationen, die ein für eine bestimmte Aminosäure codierendes Codon so verändern, daß dieses für keine Aminosäure mehr codiert und die Polypeptidsynthese vorzeitig abbricht, wenn im Verlauf der Translation der Ort des nonsense-Codons in der mRNA erreicht wird.

Im biochemischen Teil der Arbeit wurden die Enzymaktivitäten der NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase, der Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase und der Cytochromoxidase nach verschiedenen Aufzuchtssowie bei unterschiedlichen Meßtemperaturen bestimmt. So ergeben sich bei den Mutanten die verschiedensten Kombinationen von erhöhter, gleichgebliebener oder verminderter Enzymaktivität bezüglich des Wildtyps.

Die Mutanten rdt-104, rdt-110, rdt-118, rdt-133, rdt-139 und rdt-149

sind dadurch charakterisiert, daß ihre Aktivitäten der NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase und Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase beim Wechsel der Meßtemperatur von 23° C auf 36° C signifikant abnehmen (meist auf etwa die Hälfte); die Cytochromoxidase-Aktivität vermindert sich bei diesem Vorgang nicht. Es besteht die Möglichkeit, daß bei dieser Mutantengruppe ein Enzym in den Komplexen I, II oder III der Atmungskette temperatursensibel geworden ist. Denkbar wäre auch die Induktion eines lytischen Systems durch die Erhöhung der Meßtemperatur. So konnte nach Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten in der Mitochondrienfraktion hohe Proteaseaktivität festgestellt werden (Haid, pers. Mitteilung). Andererseits können aber auch beide Möglichkeiten zusammentreten: der Effekt eines eventuell vorhandenen thermolabilen Enzyms kann durch die Aktivität lytischer Enzyme überlagert werden, welche ebenfalls temperaturabhängig sein kann.

Die Mutante rdt-101 bildet von allen restlichen Mutanten insofern eine Ausnahme, als sie zur obigen Gruppe entgegengesetztes Verhalten zeigt und alle drei gemessenen Enzymaktivitäten beim Wechsel der Meßtemperatur von 23° C auf 36° C auf das Doppelte der Wildtypaktivität zunehmen. Bei dieser Mutante kann auf einen regulatorischen Defekt der Atmungskettenenzyme geschlossen werden, der durch die Temperaturerhöhung induziert wird.

Bei der Mutante rdt-109 wirkt sich die Mutation zur temperatursensiblen Atmungsdefizienz besonders vielfältig aus: fast sämtliche Enzymaktivitäten liegen unter 50 % der des Wildtyps.

Die Enzymaktivitäten der NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase und der Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase einer Reihe weiterer Mutanten (rdt-115, rdt-125, rdt-135) liegen dagegen bei allen Tem-

peraturen über der des Wildtyps. Zusammenfassend kann mit diesen Beispielen belegt werden, daß sich unter den temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten im gleichen Maß Pleiotrope befinden, wie unter den von Wolf et al. (1971) induzierten allgemein Atmungsdefekten. Durch den Ansatz temperatursensibler Mutanten konnten also ebenfalls keine Mutanten mit punktuellen Ausfällen isoliert werden.

5 Zusammenfassung

1. Durch Inkubation mit MNNG unter Bedingungen des Wachstums bzw. des Wachstumestillstands wurden temperatursensibel atmungsdefekte Mutanten induziert und durch Stempeln auf Glycerin-Medium selektiert. Diese Mutanten wachsen bei der erlaubten Temperatur (23°C) auf unvergärbarem Substrat, nicht jedoch bei der unerlaubten Temperatur von 36°C .
2. Die Freisporanalyse weist nach Kreuzung mit atmungskompetenten Partnern für alle Mutanten einen chromosomalen Charakter des Gens nach, welches im mutierten Zustand die temperatursensible Atmungsdefizienz bedingt.
3. Durch Kreuzung der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten mit Stämmen, die in der Sporulation defekt sind, konnten Diploide erhalten werden, die sich als atmungskompetent erwiesen. Die rdt-Mutationen können somit als rezessiv klassifiziert werden.
4. Nach induzierter Haploidisierung dieser Diploiden durch pfPA bzw. mfPA ergaben sich wieder atmungskompetente und temperatursensibel atmungsdefekte Nachkommen. Bei einer Mutante konnte auf diese Weise die Lage der rdt-Mutation auf dem Chromosom II nachgewiesen werden.
5. Durch qualitative und quantitative Kreuzungsanalysen wurde eine genetische Klassifizierung der Mutanten durchgeführt. Ihre Mutationsorte konnten 15 verschiedenen Segmenten zugewiesen werden.
6. Unter Verwendung eines Sporulationsdefizienz-Markere wurden die Mutanten untereinander einer Komplementationsanalyse unterzogen. So konnte bei einer Mutante intracistronische Komplementation mit einer Reihe weiterer alleler Mutanten festgestellt werden.
7. Spontan entstandene atmungskompetente Revertanten wurden zum größ-

ten Teil als Suppressormutanten identifiziert.

8. Das Wachstum der temperatursensibel atmungsdefekten Mutanten wurde in Glycerin-Flüssigmedium bei der erlaubten (23° C) und beim Wechsel zu 36° C untersucht.

9. Durch Überprüfung mit TTC konnte bei sämtlichen Mutanten eine Restatmung auf Glucose-Agar auch bei 36° C nachgewiesen werden.

10. Durch Gabe von Sorbitol bzw. Mannitol kann bei mehreren Mutanten eine "osmotische Heilung" erzielt werden; Wachstum auf Glycerin-Medium bei 36° C ist dann wieder möglich.

11. Über Enzymtests wurde die enzymatische Aktivität einzelner Abschnitte der Atmungskette unter verschiedenen Aufzucht- und Meßbedingungen geprüft.

6 Literaturverzeichnis

- Adondi, G., Heslot, H.: Etude des conversions mitotiques au niveau du gène *ad-9* de *Schizosaccharomyces pombe*. *Mutation Res.* 9, 41 - 58 (1970)
- Bachofen, V., Schweyen, R. J., Wolf, K., Kaudewitz, F.: Quantitative selection of respiratory deficient mutants in yeasts by Triphenyl-tetrazolium Chloride. *Z. Naturforschg.* 27b, 252 - 256 (1972)
- Bonatti, S., Simili, M., Abbondandolo, A.: Isolation of temperature-sensitive mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bact.* 109, 484 - 491 (1972)
- Bresch, C., Müller, G., Egel, R.: Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast. *Molec. gen. Genet.* 102, 301 - 306 (1968)
- Bulder, C. J.: Induction of petite mutation and inhibition of respiratory enzymes in various yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 30, 1 - 9 (1964)
- Clark-Walker, G. D., Linnane, A. W.: The biogenesis of mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. A comparison between cytoplasmic respiratory-deficient mutant yeast and chloramphenicol-inhibited wild type cells. *J. Cell Biol.* 34, 1 - 14 (1967)
- Crandall, M.: A respiratory-deficient mutant in the obligately aerobic yeast *Hansenula wingei*. *J.gen. Microbiol.* 75, 377 - 381 (1973)
- Edger, R. S., Denhardt, G. H., Epstein, R. H.: A comparative genetic study of conditional lethal mutations of bacteriophage T4D. *Genetics* 49, 635 - 648 (1964)
- Ephrussi, B., Hottinguer, H., Chimenes, A. M.: Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur* 76, 351 - 367 (1949 a)
- Ephrussi, B., Hottinguer, H., Tavlitzki, J.: Action de l'acriflavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur* 76, 419 - 422 (1949 b)

- Faye, G., Fukuhara, H., Grandchamp, C., Lazowska, J., Michel, F., Casey, J., Getz, G. S., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Slonimski, P. P.: Mitochondrial nucleic acids in the petite colonic mutants: deletions and repetitions of genes. *Biochimie* 55, 779 - 792 (1973)
- Fincham, J. R. S., Coddington, A.: Complementation at the *am* locus of *Neurospora crassa*: a reaction between different mutants forms of glutamate dehydrogenase. *J. molec. Biol.* 6, 361 - 373 (1973)
- Fischer, P., Binder, M., Wintersberger, U.: A study of the chromosomes of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* by light and electron microscopy. *Exptl. Cell Res.* 96, 15 - 22 (1975)
- Fishbein, L., Flamm, W. G., Falk, H. L.: Chemical Mutagens. Environmental Effects on Biological Systems. New York, London: Academic Press 1970
- Flores da Cunha, M.: Mitotic mapping of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genet. Res., Camb.* 16, 127 - 144 (1970)
- Goffeau, A., Colson, A. M., Landry, Y., Foury, F.: Modifications of mitochondrial ATPase in chromosomal respiratory-deficient mutants of a "petite-negative" yeast: *Schizosaccharomyces pombe* 972 h⁻. *Biochem. biophys. Res. Comm.* 48, 1448 - 1454 (1972)
- Goldring, E. S., Grossmann, L. J., Krupnick, D., Cryer, D. R., Marmur, J.: Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J. molec. Biol.* 52, 323 - 335 (1970)
- Gutz, H.: Induction of mitotic segregation with p-fluorophenylalanine in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bact.* 92, 1567 - 1568 (1966)
- Gutz, H.: Site specific induction of gene conversion in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 69, 317 - 337 (1971)
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loprieno, N.: *Schizosaccharomyces pombe*. In: Handbook of Genetics (King, R. C. ed.), vol. I, p. 395 - 446. New York, London: Plenum Press 1974

- Handwerker, A., Schweyen, R. J., Wolf, K., Kaudewitz, F.: Evidence for an extrakaryotic mutation affecting the maintenance of the rho factor in yeast. *J. Bact.* 113, 1307 - 1310 (1973)
- Hatefi, Y., Rieske, J. S.: The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (Complex I - III of the respiratory chain). In: *Methods in Enzymology* (Estabrook, R. and Pullman, M. R. eds.), vol. X, p. 225. New York, London: Academic Press 1967
- Hawthorne, D. C., Friis, J.: Osmotic-remedial mutants. A new classification for nutritional mutants in yeasts. *Genetics* 50, 829 - 839 (1964)
- Hawthorne, D. C., Mortimer, R. K.: Super-suppressors in yeast. *Genetics* 48, 617 - 620 (1963)
- Herman, A. J., Griffin, P. S.: Respiratory-deficient mutants in *Saccharomyces lactis*. *J. Bact.* 96, 457 - 461 (1968)
- Heslot, H., Louis, C., Goffeau, A.: Segregational respiratory-deficient mutants of a "petite negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bact.* 104, 482 - 491 (1970)
- Kohli, J.: Mitotische und meiotische Chromosomenkartierung bei *Schizosaccharomyces pombe*. Lizentiatsarbeit, Universität Bern 1973
- Kohli, J.: Chromosomenkartierung bei *Schizosaccharomyces pombe*. Dissertation, Universität Bern 1976
- Koller, S.: Tafeln zur Beurteilung von Häufigkeiten. In: *Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen*. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag 1969
- Lang, B., Burger, G., Wolf, K., Bandlow, W., Kaudewitz, F.: Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁-segment of the respiratory chain in yeast. III. Isolation and characterization of an Antimycin resistant mutant ANT 8 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec. gen. Genet.* 137, 353 - 363 (1975)
- Leupold, U.: Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei

- Schizosaccharomyces pombe. Compt. rend. Lab. Carlsberg, Ser. physiol. 24, 381 - 480 (1950)
- Leupold, U.: Methodisches zur Genetik von Schizosaccharomyces pombe. Schweiz. Z. allg. Path. Bakt. 18, 1141 - 1146 (1955)
- Leupold, U.: Genetical methods for Schizosaccharomyces pombe. In: Methode in Cell Physiology (Prescott, D. M. ed.), vol. IV, p. 169 - 177. New York, London: Academic Press 1970
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
- Marpurgo, G.: Somatic segregation induced by p-fluorophenylalanine. Aspergillus News Letters 2, 10 (1961)
- McCully, E. K., Robinow, C. F.: Mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe: a comparative study with light and electron microscopy. J. Cell Sci. 9, 475 - 507 (1971)
- Ogur, M., John, R. S., Nagai, S.: Tetrazolium overlay technique for population studies of respiratory deficiency in yeast. Science 125, 928 - 929 (1957)
- Schwab, R., Sebald, M., Kaudewitz, F.: Influence of ethidium bromide on respiration in Schizosaccharomyces pombe. Molec. gen. Genet. 110, 361 - 366 (1971)
- Sherman, F.: Respiration deficient mutants of yeast. I. Genetics. Genetics 48, 375 - 385 (1963)
- Sherman, F., Slonimski, P. P.: Respiration deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. Biochim. biophys. Acta 90, 1 - 15 (1964)
- Slonimski, P. P., Perrodin, G., Croft, J. H.: Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal petites. Biochem. biophys. Res. Comm. 30, 232 - 239 (1968)
- Tisdale, H. D.: Preparation and properties of Succinic-Cytochrom c

- reductase (Complex I - III). In: Methods in Enzymology (Estabrook, R. and Pullman, M. R. eds.), vol. X, p.213. New York, London: Academic Press 1967
- Tzagoloff, A.: Cytoplasmic and nuclear mutations affecting mitochondrial functions. In: Mitochondria. Bioenergetics, Biogenesis and Membrane Structure (Packer, L. and Gómez-Puyon, A. eds.), p. 241 - 250. New York, London: Academic Press 1976
- Uchida, A., Suda, K.: A mutant of yeast with temperature sensitive respiration. Japan J. Genet. 45, 261 - 268 (1970)
- Weislogel, P. O., Butow, R. A.: Low temperature and chloramphenicol induction of respiratory deficiency in a cold-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 67, 52 - 58 (1970)
- Wharton, D. C., Tzagoloff, A.: Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. In: Methods in Enzymology (Estabrook, R. and Pullman, M. R. eds.), vol. X, p. 245. New York, London: Academic Press 1967
- Wolf, K.: Induktion, selektive Anreicherung, genetische und biochemische Charakterisierung atmungsdefekter Mutanten der Späthefe *Schizosaccharomyces pombe* L. Dissertation, Universität München 1973
- Wolf, K., Sebald-Althaus, M., Schweyen, R. J., Kaudewitz, F.: Respiration deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. I. Molec. gen. Genet. 110, 101 - 109 (1971)

Lebenslauf

geboren am 9. Juni 1947 in Stuttgart

Namen der Eltern: Josef Pretsch, Kamilla Pretsch geb. Schönwälder

Ausbildung

1954 - 1958 Grundschule in Fellbach (Württ.)

1958 - 1966 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Fellbach (Württ.)
Abschluß mit Abitur

1967 - 1970 Studium der Fächer Biologie und Mathematik an
der Universität Stuttgart

1970 - 1973 Studium des Fachs Biologie an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

1973 Diplom-Biologen-Hauptprüfung
Beginn der Dissertation am Genetischen Institut

